



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL INTRÓN 3 DE LA HORMONA DE
CRECIMIENTO BOVINO (BGH) CON PARÁMETROS DE CRECIMIENTO Y
REPRODUCTIVOS EN NOVILLAS HOLSTEIN DEL DEPARTAMENTO DE
ANTIOQUIA.**

JULIANA ARANGO GAVIRIA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2012



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN

**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL INTRÓN 3 DE LA HORMONA DE
CRECIMIENTO BOVINO (BGH) CON PARÁMETROS DE CRECIMIENTO Y
REPRODUCTIVOS EN NOVILLAS HOLSTEIN DEL DEPARTAMENTO DE
ANTIOQUIA.**

JULIANA ARANGO GAVIRIA

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de
Magister en Ciencias-Biotecnología

Codirectores

Ph.D., Julián Echeverri Zuluaga

Ph.D., Albeiro López Herrera

Línea de Investigación

Genética y Mejoramiento Animal

Grupo de Investigación: BIOGEM

Universidad Nacional de Colombia

Medellín, Colombia

2012

CONTENIDO

Introducción.....	1
Objetivos	2
Objetivo general.....	2
Objetivos Específicos.....	3
Capitulo 1	5
Revisión: Asociación del polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona de crecimiento bovino (BGH) con algunos parámetros de crecimiento y reproductivos en novillas Holstein del departamento de Antioquia.....	5
1.1 Rol fisiológico de la hormona de crecimiento bovino.....	6
1.2 Funciones fisiológica de la hormona de crecimiento bovino (BGH).....	7
1.3 Descripción del gen de la hormona de crecimiento.....	8
1.4 Gen de la BGH	9
1.5 Frecuencias alélicas y genotípicas del gen BGH.....	13
1.6 Asociación de los polimorfismos del gen BGH-MspI con algunos parámetros de crecimiento y reproductivos en novillas Holstein del departamento de Antioquia. ...	15
1.7 Efecto del polimorfismo del gen BGH-MspI con características de importancia económica	16
1.8 Efecto del polimorfismo del gen BGH-MspI con características reproductivas y de crecimiento.....	18
1.9 Referencias.....	18
Capitulo 2	27
Asociación del polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona de crecimiento bovino (BGH) con parámetros reproductivos en ganado Holstein del departamento de Antioquia.....	27
2.1 Resumen.....	27
2.2 Abstract.....	28
2.3 Introducción	28
2.4 Materiales y métodos.....	30

2.4.1 Áreas y población en estudio	30
2.4.2 Extracción de DNA y determinación de las variantes genotípicas.....	30
2.4.3 Estimación de las frecuencias alélicas.....	31
2.4.4 Análisis estadístico.....	32
2.5 Resultados.....	34
2.5.1 Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen de la hormona de crecimiento (BGH)	34
2.5.2 Análisis descriptivo	34
2.5.3 Efecto del genotipo sobre las edades de los eventos reproductivos	35
2.5.4 Efecto de sustitución alélica del polimorfismo del gen BGH sobre las edades a las cuales se presentan algunos eventos reproductivos	37
2.6 Discusión.....	38
2.7 Conclusiones	40
2.8 Referencias.....	40
Capítulo 3	45
Asociación del polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona de crecimiento bovino con características de crecimiento en novillas Holstein del departamento de Antioquia.....	45
3.1 Resumen.....	45
3.2 Abstract.....	46
3.3 Introducción	46
3.4 Materiales y métodos.....	48
3.4.1 Áreas y población en estudio	48
3.4.2 Extracción de DNA y determinación de las variantes genotípicas.....	48
3.4.3 Estimación de las frecuencias alélicas.....	50
3.4.4 Análisis estadístico	50
3.5 Resultados	52

3.5.1 Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona de crecimiento (BGH)	52
3.5.2 Análisis descriptivo de las características de crecimiento de las novillas Holstein	53
3.5.3 Efecto del genotipo sobre las características de crecimiento	53
3.5.4 Efecto de sustitución alélica del polimorfismo del intrón 3 del gen BGH sobre las características de crecimiento de novillas Holstein de Antioquia.	55
3.6 Discusión.....	55
3.7 Conclusiones	57
3.8 Referencias.....	58
Capitulo 4	63
Asociación del polimorfismo del intrón 3 de la hormona de crecimiento bovino (BGH) con características reproductivas en ganado Holstein del departamento Antioquia	63
4.1 Resumen.....	63
4.2 Abstract	64
4.3 Introducción	64
4.4 Materiales y métodos.....	66
4.4.1 Áreas y población en estudio	66
4.4.2 Extracción del ADN de células de sangre.....	66
4.4.3 Estimación de las frecuencias alélicas.	67
4.4.4 Análisis estadístico	68
4.5 Resultados	69
4.5.1 Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del intrón 3 del gen de BGH.....	69
4.5.2 Análisis descriptivo	70
4.5.3 Efecto del genotipo sobre las características reproductivas.....	70
4.5.4 Efecto de sustitución alélica del polimorfismo del gen BGH sobre las características reproductivas en vacas Holstein del departamento de Antioquia	72

4.6 Discusión.....	72
4.7 Conclusiones.....	74
4.8 Referencias.....	74
5 Conclusiones y recomendaciones.....	79
Agradecimientos.....	80

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Polimorfismos más estudiados del gen BGH.....	11
Tabla 1.2 Localización y posición de otros polimorfismos del gen BGH.	12
Tabla 1.3 Frecuencias alélicas del gen BGH-MspI de diferentes razas.....	14
Tabla 2.1 Media, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) para la edad al primer servicio, edad al primer parto, edad al primer servicio postparto y edad al segundo parto en vacas Holstein del departamento de Antioquia.	35
Tabla 2.2 Análisis de medias de Tukey para la edad al primer servicio, primer parto, primer servicio postparto y segundo parto, en vacas Holstein del departamento de Antioquia.	36
Tabla 2.3 Análisis de regresión para las características edad al primer servicio, primer parto, primer servicio postparto y segundo parto	37
Tabla 3.1 Media, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) para peso al primer servicio, peso al primer parto y ganancia diaria de peso de novillas Holstein del departamento de Antioquia.	53
Tabla 3.2 Asociación entre los genotipos del intrón 3 del gen BGH con peso al primer servicio, peso al primer parto y ganancia diaria de peso de novillas Holstein del departamento de Antioquia.	54
Tabla 3.3 Coeficientes de regresión para las características peso al primer servicio, peso al primer parto y ganancia diaria de peso para novillas Holstein del departamento de Antioquia.	55
Tabla 4.1 Media, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) para el número de servicios para la primera concepción, días abiertos e intervalo entre partos en vacas Holstein del departamento de Antioquia.	70
Tabla 4.2 Análisis de medias de Tukey para el efecto del genotipo sobre número de servicios para el primer parto, días abiertos e intervalo entre partos en vacas Holstein del departamento de Antioquia.....	71

Tabla 4.3 Coeficientes de regresión (β), para las características número de servicios, días abiertos e intervalo entre partos en vacas Holstein del departamento de Antioquia.	72
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** Estructura del gen de la hormona de crecimiento bovino y del fragmento amplificado del intrón 3 (329 pb), que es digerido por la enzima de restricción MspI. . 11
- Figura 2.2** Fragmento amplificado y patrones de restricción para el gen de la hormona de crecimiento bovino..... 34

Introducción

La productividad de un hato lechero está determinada por sus niveles de producción y por la eficiencia reproductiva de sus animales. El crecimiento y la reproducción son eventos importantes que regulan la producción y que a la vez determinan el éxito de esta actividad económica.

Un desempeño reproductivo adecuado permite una mayor producción de leche durante la vida del animal. El mayor beneficio se obtiene cuando la mayoría de las vacas tienen su primer parto alrededor de los 24 meses de edad y paren en intervalos de 13 a 13.5 meses. De este modo, la vaca pasará una mayor proporción de su vida productiva en la fase de lactancia y se logrará un parto (y una cría) al año.

El comportamiento reproductivo y la velocidad de crecimiento de los animales juegan un papel importante en la vida productiva. Es esencial considerar los factores que influyen sobre el conjunto de estos parámetros; uno de ellos es el efecto de la hormona del crecimiento bovino (BGH) que interviene en el desarrollo de tejidos, metabolismo de las grasas, homeorresis, tiene un papel importante en la reproducción, la lactancia y el crecimiento normal del cuerpo (Abolfazl, 2009). El gen que codifica para esta hormona presenta polimorfismos que podrían influenciar de manera diferente estas características.

La selección asistida por marcadores moleculares es una metodología que permite determinar, a partir de cambios en el DNA, los individuos superiores para algunas características de importancia en la producción ganadera. Tiene como ventaja que se obtiene una aceleración del progreso genético y una disminución en los costos del programa de mejoramiento genético del hato (Echeverri et al., 2011).

En cuanto al mejoramiento genético, en el último siglo se han realizado avances con caracteres asociados con el volumen de producción de leche, lo cual ha provocado que simultáneamente decline la eficiencia reproductiva. Por otra parte, debido a la baja heredabilidad y alta complejidad de estos rasgos reproductivos ha sido difícil mejorar estas características usando la metodología tradicional. El desarrollo de la genética

molecular facilita la utilización de diferentes genes que participan en esta complejidad genética de la reproducción de los animales (Albeiro et al., 2011).

El interés respecto a la asociación de la hormona de crecimiento bovino con parámetros reproductivos y de crecimiento es la influencia de las variantes genéticas en alcanzar un estado reproductivo temprano, lo que se traduce en la reducción del periodo de levante y más partos en la vida útil de la vaca. Cuando una novilla se demora en entrar al programa reproductivo o una vaca se demora en retornar al celo después del parto, se generan gastos por el periodo adicional no lactante y alargamiento del intervalo generacional (Faure y Morales, 2003).

Las variantes genéticas del gen de la hormona intervienen en diferentes niveles plasmáticos en el organismo (Zhou et al., 2005), considerando que la hormona de crecimiento interviene en el proceso normal de crecimiento del cuerpo influenciando de forma indirecta la eficiencia reproductiva del bovino (Zhou et al., 2005; Pereira et al., 2005; Curi et al., 2005), el gen puede ser candidato para ser utilizado en la selección asistida por marcadores moleculares.

Aprovechando el conocimiento del papel biológico de la BGH en el crecimiento longitudinal, el desarrollo, la lactancia y la reproducción, la búsqueda de asociación de polimorfismos con características reproductivas y de crecimiento son un tema importante de investigación.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la asociación del polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona de crecimiento bovino (BGH), con características de crecimiento y algunos parámetros reproductivos relacionados con el inicio y la evolución de la vida productiva en novillas Holstein del departamento de Antioquia.

Objetivos Específicos

- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes genéticas resultantes del polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona del crecimiento bovino (BGH).
- Establecer la asociación del polimorfismo genético de BGH con características de crecimiento asociadas al inicio de la vida productiva en novillas Holstein.
- Explorar la asociación del polimorfismo genético de BGH con algunas características reproductivas en novillas de primer parto.
- Analizar la asociación del polimorfismo del gen BGH con algunos parámetros reproductivos en vacas Holstein del departamento de Antioquia.

Capítulo 1

Revisión: Asociación del polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona de crecimiento bovino (BGH) con algunos parámetros de crecimiento y reproductivos en novillas Holstein del departamento de Antioquia.

Review: Association of polymorphism of intron 3 in the gene of the bovine growth hormone (BGH) with some growth and reproductive parameters in Holstein heifers of Antioquia department.

El objetivo del mejoramiento genético en bovinos es sin duda lograr avances en diferentes características de importancia económica, la mayoría de estos caracteres son cuantitativos siendo los valores observados (valores fenotípicos), que se cuantifican en medidas métricas (Kg de proteína, Kg de grasa etc.), el efecto de la expresión fenotípica de estos valores es gobernando por la interacción de una gran cantidad de genes que tienen un efecto fenotípico bajo individualmente y que además su expresión se ve influenciada por efectos medio ambientales.

Por otro lado el fenotipo determinado por características de carácter cualitativo (características no medibles) son gobernados por pocos genes y su expresión se ve muy poco influenciada por los efectos medio ambientales, entre estos rasgos tenemos el color del pelaje, la presencia o no de cuernos etc.

El primero en aplicar la selección a partir de la productividad individual y la utilización de pruebas de progenie fue el inglés Roberto Backwell en 1760-1795, es así como surgieron el tipo ideal de muchas razas nuevas; el segundo fue el trabajo del monje agustino Mendel, que evidenció por primera vez la existencia de genes a través de experimentos de hibridación de plantas que condujeron al inicio de la genética (Echeverri et al., 2011).

Los avances obtenidos en el mejoramiento genético implican la selección de animales que han sido objeto clave en el proceso de mejora, ya que su potencial adquirido se

traduce en animales más productivos y rentables, al realizar selección de los animales superiores se aumenta la frecuencia de alelos favorables para tales rasgos de interés económico.

Con el desarrollo de nuevas tecnologías en biología molecular se han identificado genes relacionados con características productivas con el fin de llevar a cabo programas de mejoramiento más eficientes. El beneficio de implementar selección asistida por marcadores moleculares asociados con parámetros de importancia económica es permitir seleccionar progenitores para mejora de característica de interés en la producción ganadera incluso antes del nacimiento del animal (genotipificando el embrión), con la ventaja de obtener aceleramiento del progreso genético y una disminución de costos (López et al., 2011).

La aparición de marcadores moleculares no solo ayuda a eliminar los inconvenientes de la selección basada en el análisis exclusivo del fenotipo, sino también la detección de susceptibilidad a enfermedades, la propensión de sufrirlas y la localización de resistencia a estas mismas, sin contar diversas aplicaciones como cuantificación de la variabilidad génica intra e interespecífica, mejoras genéticas, mapeo de genomas, dispersión de especies y diferenciación de individuos (López et al., 2011).

1.1 Rol fisiológico de la hormona de crecimiento bovino

El crecimiento y la reproducción son eventos importantes que regulan la producción de un hato lechero, controlados por la interacción de varias hormonas polipeptídicas, que regulan estos dos procesos biológicos. La hipófisis es una de las glándulas más importantes del cuerpo, ya que segrega las hormonas que rigen dichos procesos vitales entre ellas la hormona de crecimiento bovino. Esta glándula pequeña de secreción interna se relaciona con una estructura nerviosa llamada hipotálamo, creando formaciones histológicas fundamentales en la relación del sistema endocrino y nervioso, segrega seis tipos de hormonas que son fisiológicamente relevantes para el organismo, por cinco clases de células y se caracteriza por tener dos lóbulos, anterior y posterior que difieren en su estructura y función (Etherton, 1998).

La hormona de crecimiento bovino es producida principalmente en el lóbulo anterior de la hipófisis, siendo esta porción la más importante para estos dos procesos fisiológicos.

1.2 Funciones fisiológica de la hormona de crecimiento bovino (BGH).

La función clásica de la BGH es la regulación del crecimiento postnatal, la diferenciación de diferentes tipos de células, el control del anabolismo y el metabolismo de órganos y tejidos (Schams, 1999), juega un papel fisiológico en el control del desarrollo, en la composición corporal, la tasa de crecimiento y la función reproductiva masculina (Andrzej, 2000), y además afecta la producción que se traduce en una mayor producción de leche y una mejora de la eficiencia (Bauman, 1999). Inclusive se conoce que la hormona es importante como factor de supervivencia celular y en el desarrollo del cáncer (Outwater et al., 1997).

La BGH además de facilitar el aumento del tamaño de las células y de los tejidos debido a la estimulación de la mitosis, da lugar a la diferenciación de algunas poblaciones celulares del organismo, fomenta el transporte de aminoácidos a través de membranas celulares para la síntesis de proteínas y reduce la grasa corporal por la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo al torrente sanguíneo aumentando la masa magra. La BGH tiene un efecto directo sobre el hígado, en el que induce la producción del factor 1 de crecimiento insulinoide (IGF-1), que a la vez actúa sobre el tejido glandular mamario durante la lactancia (Echeverri, 2005), influyendo en el aumento de la tasa celular de la síntesis de la leche y el mantenimiento de células secretoras (Bauman, 1999). Por otro lado su acción sobre los diferentes tejidos, además de depender de este factor también lo hace de otros como lo son la insulina, los carbohidratos, la tiroxina (Douglas, 1996).

La mayor parte de las acciones de BGH están mediadas por el IGF-1, mediador clave de su acción durante el desarrollo posnatal y la edad adulta. Las acciones son moduladas por complejos con proteínas de unión a IGF-1 (IGF-BPs), por lo menos 6 de los cuales se han identificado hasta ahora y por proteasas que actúan como IGF-BPs y mediadas principalmente por el IGF-1 que se produce en el hígado, así como en IGF-1 producido

a nivel local en diferentes órganos diana actuando como reguladores paracrino y autocrinos (Andrzej, 2000), actualmente se conoce que la producción de esta hormona no solo se realiza en la hipófisis, también se expresa en múltiples tejidos (Derek et al., 2001).

En estudios recientes se ha descubierto que el aumento de las concentraciones de la hormona de crecimiento está asociado con un mayor rendimiento de la leche en las vacas (Chagas et al., 2007), ya que se ha encontrado que los niveles circulantes de la hormona son altos en vacas lactantes de alta producción, incluso la aplicación de BGH de manera exógena provoca que estos niveles aumenten y por ende la producción de leche incrementa, es así como la expresión de esta hormona, afectada por las regiones génicas de esta proteína han sido objetivo de investigaciones en mejoramiento genético (Paul et al., 2002).

La BGH es necesaria para el desarrollo de tejidos, el metabolismo de las grasas y la homeorresis, por lo que tiene papeles fisiológicos importantes en la reproducción, entre ellos la esteroidogénesis, donde activa varias enzimas (Kerry et al., 2000), la lactancia, el crecimiento normal cuerpo (Abolfazl, 2009) y la modulación de la expresión de otros genes que influyen en la resistencia de enfermedades (Lincoln et al., 1995), además coordina eventos como la gluconeogénesis, que interviene en la síntesis de lactosa en la leche.

Al jugar un papel importante en los procesos biológicos del desarrollo de la glándula mamaria, la lactancia y el crecimiento (Etherton, 1998; Lucy, 2008), es un prometedor gen marcador para el mejoramiento en crecimiento, producción de leche y en ganado de carne.

1.3 Descripción del gen de la hormona de crecimiento

Actualmente el uso de técnicas moleculares, el conocimiento del genoma bovino y diversas investigaciones ofrecen una serie importante de posibilidades para la mejora genética animal en menor tiempo, permitiendo la identificación de regiones genómicas

en diferentes genes que están asociados con características fenotípicas de importancia económica en los animales.

La hormona del crecimiento (GH) cumple diversas funciones, por esta razón se han buscado secuencias polimórficas en los genes que codifican dicha proteína, con el uso de técnicas moleculares que permiten detectar variaciones o polimorfismos existentes en los individuos para regiones específicas del DNA, esto con el fin de utilizarlos para construir mapas genéticos y evaluar su efecto sobre la expresión de características específicas (Montaldo y Mesa, 1998).

Hay evidencias de la asociación de las variantes genéticas del gen BGH con los niveles plasmáticos de la hormona, indicando que las variaciones de los niveles de la hormona pueden ser causadas por mutaciones en el gen. La identificación de dichas mutaciones es la que permite hacer selección sin medir necesariamente los niveles de GH (Uffo et al., 2002).

1.4 Gen de la BGH

El gen de la BGH está localizado en el cromosoma 19 (19q26), tiene 1800bp y está compuesto de 5 exones y 4 intrones (Vukasinovic, 1997), que se traduce en una proteína de 191 aminoácidos de un peso molecular de 22 kD (Lingappa et al., 1977), su estructura se caracteriza por contener residuos de aminoácidos de alanina (Ala) o fenilalanina (Phe) en su N-terminal como proceso alternativo del precursor de BGH y tener dos enlaces disulfuro en las posiciones 53-164 y 181-189 (Secchi y Borromeo, 1997).

Se han realizado investigaciones donde se han estudiado las asociaciones genéticas entre polimorfismos y el locus de la BGH con características de producción de leche (Lagziel, 1996; Vukasinovic, 1997), ya que algunas regiones tienen un alto potencial para realizar estos estudios de variación molecular. El gen en bovinos que codifica para la hormona crecimiento presenta polimorfismos (cambios en la secuencia de nucleótidos), en las regiones 5' del promotor, intrónica, exónica y la regulatoria 3' (Mullen et al., 2010).

Gordon et al. (1983) describen que la estructura de este gen tiene un alto grado de polimorfismo, donde varios sitios polimórficos han sido encontrados (Hoj et al., 1993; Lucy et al., 1993; Zhang et al., 1993; Unanian et al., 2000). Adicionalmente varios autores han identificado polimorfismo en el promotor, tercer y cuarto intrón y quinto exón en el gen (Lucy et al., 1993; Yao et al., 1996; Ge et al., 1996)

Los dos polimorfismos más estudiados y que han sido asociados a características de interés económico en bovinos son las mutaciones en el intrón tres (una transición de T a C) y la del exón cinco (una transversión C y G; sustitución de una Leu por una Val en la proteína), y son detectados por las enzimas de restricción MspI y AluI respectivamente (Lucy et al., 1993; Zhang et al., 1993).

En cuanto a la mutación del exón 5, las dos formas de la hormona, son debidas a la sustitución de una Citosina (C) por una Guanina (G) en la posición 2141, que genera una alteración de un aminoácido de Leucina (L; codón CTG) a una Valina (V, codón GTG); dando como resultado a dos formas de un polipéptido de 127 aminoácidos que tiene importancia en la producción de leche, ya que en el ganado Holstein el genotipo homocigótico mencionado en el codón es leucina, mientras que en el ganado jersey es Valina (Lucy et al., 1993). Esta transversión permite la determinación de genotipos polimórficos de la BGH en variantes LL, LV, VV (Mullen et al., 2010). Además este polimorfismo también ha sido asociado con el rendimiento productivo de los toros, donde se observó un volumen de eyaculado inferior para los toros de genotipo LL (Lechniak et al., 1999).

Otro sitio polimórfico de un solo nucleótido para el gen de la BGH se encuentra en el intrón 3, puede ser determinado con el uso de SSCP y PCR-RFLP y está ubicado en la posición 1547 (intrón 3), su base molecular radica en la inserción de una T en la posición +837 y una transición de C-G en la posición +838, generando el sitio de restricción (Zhang et al., 1993), y en donde el alelo GH⁺ presenta una citosina y el alelo GH⁻ presenta una timina (T) (Lee et al., 1993), polimorfismo reconocido por la enzima de restricción MspI, generando 3 genotipos diferentes (Dybus, 2002) y ha sido asociado con producción de leche y contenido de grasa (Hoj et al., 1993). **Figura 1.1.**

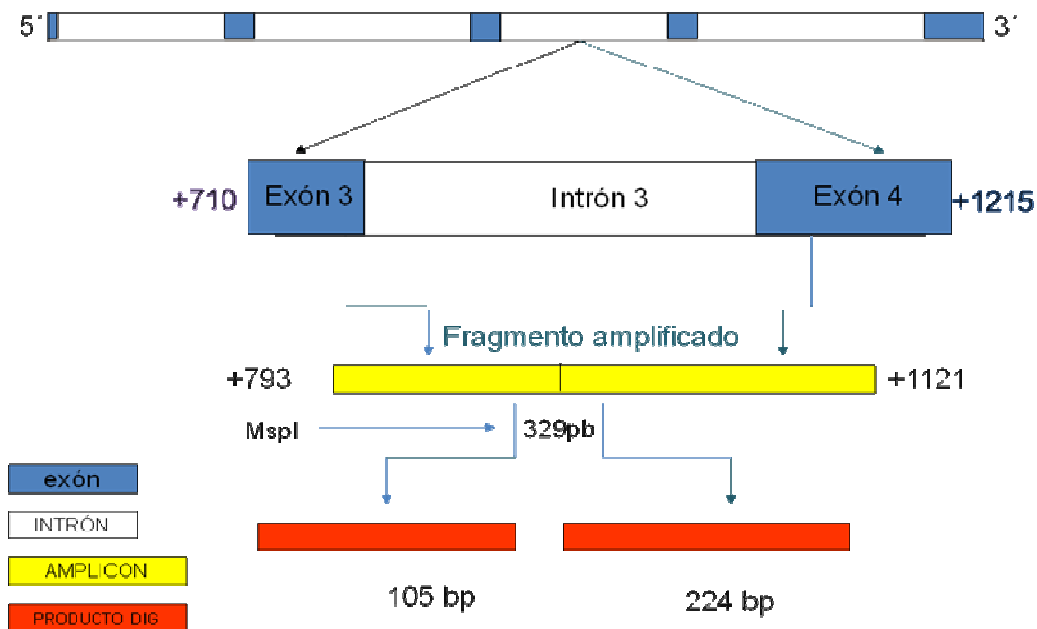


Figura 1.1 Estructura del gen de la hormona de crecimiento bovino y del fragmento amplificado del intrón 3 (329 pb), que es digerido por la enzima de restricción MspI.

También han sido reportados otros polimorfismos como el que es reconocido por la endonucleasa de restricción TaqI, que es debido a una inserción/delección de la región de terminación 3' ubicado entre el sitio de restricción de EcoRI y el TaqI (Rocha et al., 1992), otro polimorfismo en donde se produce un cambio de la secuencia de aminoácido de una Metionina por una Treonina en la posición 172 (Chikuni et al., 1994), y en el que ocurre una transversión de una A (Adenina) a una C (Citosina), en la posición 2291 (Yao et al., 1996). Adicionalmente, Ge et al. (2003) identificaron tres polimorfismos en la región promotora del gen. La tabla 1.1 presenta la lista de los principales polimorfismos descritos para el gen BGH.

Tabla 1.1 Polimorfismos más estudiados del gen BGH

Polimorfismo	Referencia
Exón 5, una transversión C y G; sustitución de una Leu por una Val en la proteína, en la posición 2141,	Lucy et al., 1993

reconocido por la enzima de restricción AluI.

Intrón 3, inserción de una T en la posición +837 y una transición de C-G en la posición +838, en la posición 1547, reconocido por la enzima de restricción MspI. Dybus, 2002

Intrón 3, una transición de una T por una C, en la posición 1692. Yao et al., 1996

Exón 5, una transversión de una A a una C, en la posición 2291. Yao et al., 1996

Polimorfismo que se produce en la posición 172 , ocasiona un cambio de Treonina por una Metionina. Chikuni et al., 1994

Mullen et al (2010) identificaron un total de 63 polimorfismos a través de una nueva secuenciación del gen, de los cuales 25 polimorfismos de nucleótido simple (SNP) habían sido descritos con anterioridad en la literatura, los SNP identificados fueron 41 (25 nuevos) en la región 5' (UTR) del gen, 7 (5 nuevos) en el intrón entre los exones 4 y 5; 3 (1 nuevo) en el exón 5 y 12 (7 nuevos) en la región 3', por lo tanto fueron identificados un total de 38 nuevos polimorfismos en el gen de BGH, de los cuales algunos se describirán a continuación. (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Localización y posición de otros polimorfismos del gen BGH.

SNP	Localización	Posición del nucleótido en el cromosoma 19
GH3	5'	49696441

GH32	5´	49693441
GH35	5´	49693328
GH38	5´	49693278
303	5´	49660275
GH17	3´	49657371
GH19	3´	49657225
GH24	3´	49657093
GH21	3´	49656852

Modificado de Mullen et al., 2010.

1.5 Frecuencias alélicas y genotípicas del gen BGH

Mattos et al. (2004) y Sodhi et al. (2007), demostraron en sus estudios que las frecuencias tanto alélicas como genotípicas del gen BGH varían entre el ganado Bos Indicus y Bos taurus y dentro de sus razas (Moody et al., 1996), además se ha comprobado que el alelo (+) del polimorfismo MspI es mas prevalente en las poblaciones de ganado Holstein y el alelo (-) prevalente en el Cebú (Unanian et al., 2000; Pawar et al., 2007). Las frecuencias alélicas para algunas razas se presenta en la tabla 1.3.

Tabla 1.3 Frecuencias alélicas del gen BGH-MspI de diferentes razas

Raza	País	Alelo (+)	Alelo (-)	Referencia
<i>Bos indicus</i>				
Nelore	Brasil	0.15	0.85	Unanian et al., 2000
Sahiwal	Brasil	0.14	0.86	Unanian et al., 2000
Sahiwal	Alemania	0.14	0.86	Mitra et al., 1995
Brahman	USA	0.35	0.65	Lagziel et al., 2000
Gyr	Brasil	0.11	0.89	Lagziel et al., 2000
<i>Bos taurus</i>				
Holstein	Irán	0.883	0.117	Gorbani et al., 2009
	China	0.875	0.125	
	Suiza	0.91	0.09	Vukasinovic et al., 1997
	Italia	0.83	0.17	Falaki et al., 1996
	Colombia	0.85	0.15	Echeverri et al., 2010
Jersey	India	0.85	0.15	Lagziel et al., 2000
Hereford	USA	1.0	0.0	Lagziel et al., 2000
Angus	USA	0.86	0.14	Lagziel et al., 2000

Limousin	USA	0.61	0.39	Lagziel et al., 2000
Charolais	USA	0.78	0.22	Lagziel et al., 2000

Efectivamente se observa como en el ganado *Bos Taurus* prevalece el alelo (+) mientras que en el ganado *Bos indicus* prevalece el alelo (-), diferencia que ha sido explicada por el origen geográfico con la propuesta de que el polimorfismo MspI se originó en la India (Lagziel et al., 2000; Unanian et al., 2000). Estas consideraciones se deben a que geográficamente las frecuencias bajas en las razas de MspI(-) se originan en el norte de Europa, las frecuencias moderadas se originan del este de Europa y las frecuencias altas se originan en el subcontinente Indio (Lagziel et al., 2000). En consideración al tipo de la raza, las frecuencias bajas corresponden a las razas denominadas sin joroba y las altas a razas con joroba (Lagziel et al., 2000).

1.6 Asociación de los polimorfismos del gen BGH-MspI con algunos parámetros de crecimiento y reproductivos en novillas Holstein del departamento de Antioquia.

El interés con respecto a la asociación de la hormona de crecimiento con parámetros de crecimiento en bovinos productores de leche es la influencia de la acción de las variantes genéticas de la BGH en alcanzar un rápido crecimiento del animal, que le permita llegar a un estado reproductivo activo más temprano, lo que se traduce en una reducción del periodo de levante y más partos en la vida útil de la vaca, como anteriormente se dijo, las variantes genéticas del gen de la hormona interviene en los diferentes niveles plasmáticos en el organismo, considerando que la hormona de crecimiento interviene en el proceso normal de crecimiento del cuerpo, este puede ser un gen candidato para ser utilizado en selección asistida por marcadores moleculares para características de crecimiento en novillas de raza Holstein.

1.7 Efecto del polimorfismo del gen BGH-MspI con características de importancia económica

Hay numerosos genes que al tener diferencias o variaciones en su secuencia de nucleótidos (conocidos como polimorfismos de un solo nucleótido SNP), pueden ser detectados mediante técnicas moleculares, estas variaciones influyen de manera diferente dichas características. Hay una amplia variedad de marcadores moleculares que han sido asociados a características de importancia económica como el gen de BGH, Prolactina Bovina (PRL), Kappa caseína, Lactoferrina el Antígeno leucocitario Bovino (BoLA) y CD-18, este último ha sido relacionado con la resistencia a enfermedades como la mastitis (López et al., 2011).

Los primeros marcadores moleculares que se desarrollaron fueron los polimorfismos bioquímicos, el análisis de Neimann y Robertson (1961) de grupos sanguíneos, evidenció que existía un efecto significativo del grupo sanguíneo B sobre el porcentaje de grasa en la leche; por otro lado Brum et al. (1967) además de que descubrieron que la producción de leche se relacionaba con el grupo sanguíneo B, también encontraron que el rendimiento de leche se asociaba con las variantes alélicas de las transferrinas.

También se han implementado marcadores moleculares para hacer asociaciones de variantes de algunas proteínas de la leche (kappa caseína, beta-lactoglobulina, etc) y diferentes hormonas con importantes funciones fisiológicas como Prolactina (PRL) y Hormona del crecimiento Bovino (BGH) con caracteres de producción lechera (Cowan et al., 1990; Hoj et al., 1993).

No solo la producción de altos volúmenes de leche para satisfacer las necesidades a nivel mundial es suficiente; los compradores actuales exigen calidad composicional, para facilitar los procesos en la industria láctea, por eso marcadores moleculares se han desarrollado con el fin de mejorar características de nivel composicional. Las proteínas de la leche, como lo son las caseínas son importantes marcadores; el gen Gen K-caseína (CSN) tiene cerca de 8 variantes alélicas donde el alelo B ha sido el más asociado con la calidad de quesos por su mayor rendimiento proteico y con la disminución de grasa (Naranjo et al., 2007). Por otro lado el gen de la beta-lactoglobulina (LGB) tiene

aproximadamente 8 variantes genéticas de las cuales el alelo A se ha encontrado que incrementa la proteína y la producción de leche (Bobe et al., 1999).

Marcadores moleculares como la calpaína y calpastatina han sido asociados con calidad de carne, la calpaína interviene en el proceso de maduración de la carne, en este gen se han reportado cerca de 39 polimorfismos donde varios de ellos se han relacionado con su ternera (Casas et al., 2006).

También se han utilizado marcadores moleculares asociados al desempeño reproductivo de los animales como el STAT5A (Algunos de sus polimorfismos asociados con sobrevivencia embrionaria) (Khatib et al., 2008), en el gen de la leptina, se encontró que la mutación A59V tiene un efecto significativo sobre la edad al primer parto, días abiertos, intervalo entre partos y número de inseminaciones por concepción

El polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona del crecimiento se ha asociado con diferentes características de interés económico; Abolfazl (2009) reportó asociaciones con características de la biometría testicular en toros Holstein, promedio del ancho, longitud testicular y circunferencia escrotal, de las cuales el promedio de la longitud testicular y su asociación con el polimorfismo fue significativo (Gorbani et al., 2009).

Por otro lado estudios genéticos (Brum et al., 1967; Chikuni et al., 1994; Dybus, 2002) han confirmado considerables polimorfismos de la hormona y su asociación con características de producción de leche en diferentes lugares y distintas razas, encontrándose en algunas características efectos significativos como producción de leche, porcentaje de proteína, producción de proteína, porcentaje de grasa, producción de grasa y recuento de células somáticas, en ocasiones hay inconsistencias con estos efectos y por esto debe ser evaluados en distintos ambientes.

Algunos estudios sugieren que el alelo + es más favorable para producción de leche (Yao et al., 1996; Zhou et al., 2005), mientras que otros muestran que es el menos favorable (Lagziel et al., 1996), en el caso del porcentaje de proteína se ha demostrado efectos positivos para este alelo (Dybus, 2002; Zhou et al., 2005) y otras investigaciones un efecto negativo (Lagziel et al., 1996); por otro lado el porcentaje de grasa ha mostrado un efecto negativo para el alelo - por varios autores (Hoj et al., 1993; Zhou et

al., 2005; Lee et al., 1993). Adicionalmente Lagziel et al. (1996) encontraron un efecto negativo en el alelo + en el puntaje de células somáticas.

Los genotipos para este polimorfismo asociados con producción y composición láctea, sugieren que el genotipo BGH +/+ es el más favorable para producción de leche, proteína. (Dybus, 2002; Zwierzchowski et al., 2002).

1.8 Efecto del polimorfismo del gen BGH-MspI con características reproductivas y de crecimiento.

Teniendo en cuenta que la BGH tiene influencia en el crecimiento y en el desarrollo de tejidos, es probable que el gen esté relacionado con el aumento de peso (Unanian et al., 2000). Investigaciones han tenido como objetivo la búsqueda de posibles asociaciones de los polimorfismos en el gen BGH con características de crecimiento de la especie bovina, como peso al nacimiento (Rocha et al., 1992; Biswas et al., 2003) y el aumento del peso corporal (Yao et al., 1996; Unanian et al., 2000), además también se han tenido en cuenta características como la composición y la calidad de la canal en bovinos (Rocha et al., 1992).

Algunos polimorfismos se han asociado con características del tamaño del cuerpo, como el alelo T del SNP GH38 ubicado en la región 5' asociado negativamente con la estatura del animal, tres polimorfismos GH21 (región 3'), 2291 (Exón 5), GH35 (región 5') con la profundidad del cuerpo, y dos SNP 303 (Exón 5') y GH35 (región 5') con la angularidad del cuerpo (Mullen et al., 2010). Han sido pocos los estudios sobre asociaciones del polimorfismo del intrón 3 con parámetro de crecimiento y aunque se han realizado estudios de éste con estas características se han concentrado principalmente en ganado de carne.

1.9 Referencias

ABOLFAZL G, RASOUL VAEZ T, MORTAZA B, CYRUS A. Restriction fragment length polymorphism of bovine growth hormone gene intron 3 and its association with

testis biometry traits in Iranian Holstein bull. *Afr J Microbiol Res.* 2009; 3 (11): 809 - 814.

ANDRZEJ B. Effects of growth hormone on male reproductive functions. *J Androl.* 2000; 21(2): 181 - 188.

BAUMAN D. Bovine somatotropin and lactation: from basic science to comercial application . *Domest Anim Endocrin.* 1999; 17: 101 – 116.

BISWAS T, BHATTACHARVA T, NARAYAN A, BADOLA S, KUMAR P SHARMA A. Growth Hormone Gene Polymorphism and Its Effect on Birth Weight in cattle and Buffalo. *J Anim Sci.* 2003; 16 (4): 494 - 497.

BOBE G, BEITZ D, FREEMAN A, LINDBERG G. Effect of milk protein genotypes on milk protein composition and its genetic parameter estimates. *J Dairy Sci.* 1999; 82 (12): 213-220.

BRUM E, RAUSCH W, HINES H, LUDWICK T. Association between milk and blood polymorphism types and lactation traits of Holstein cattle. *J Dairy Sci.* 1967; 51 (7): 1031 – 1038.

CASAS E, WHITE S, WHEELER T, SHACKELFORD S, KOOHMARAIE M, RILEY D, et al. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J Anim Sci.* 2006; 84: 520 – 525.

CHAGAS LM, BASS J, BLACHE D, BURKE C, KAY J, LINDSAY D, et al. Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J Dairy Sci.* 2007; 90 (9): 4022 - 4032.

CHIKUNI K, NAGATSUMA T, TABATA T, MONMA M, SAITO M, OZAWA S, et al. Genetic variants of the growth hormone gene in Japanese cattle. *Anim Sci Tech.* 1994; 65 (4): 340 – 346.

COWAN C, DENTINE M, AX R, SCCHULER L. Structural variation around prolactin gene linked to quantitative traits in an elite Holstein sire family. *Theor Appl Genet.* 1990; 79: 577 – 582.

CURI A, OLIVEIRA N, SILVEIRA C, LOPES R. Association between IGF-I, IGF-IR and GHRH gene polymorphisms and growth and carcass traits in beef cattle. *Livest Prod Sci.* 2005; 94 (3): 159 - 167.

DOUGLAS A. Immunoregulatory properties of growth hormone and prolactin. *Pharmacol Ther.* 1996; 69 (3): 237 - 257.

DEREK L, CAROLYN B, SHOSHANA Y, JUN-LI L, ANDREW B. The somatomedin hypothesis:2001. *Endocrine Reviews.* 2001; 22 (1): 53 –74.

DYBUS A. Associations of growth (GH) and Prolactin (PRL) genes polymorphisms with milk production traits in Polish Black and White cattle. *Anim Sci P.* 2002; 20 (4): 203 - 212.

ECHEVERRI J. Determinación de la frecuencia alélica y genotípica de los genes de la prolactina (PRL) y hormona de crecimiento bovina (bgh) en una población de vacas Holstein Friesian en una zona del departamento de Antioquia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia .Tesis de maestría, 2005.

ECHEVERRI J, VASQUEZ N, GALLO Y. Efecto de la transición Adenina/Guanina del gen de la prolactina bovina sobre características de importancia en producción lechera. *Rev Lasallista Investig.* 2010; 7 (2): 16 - 23.

ECHEVERRI J, LOPEZ A, ARANGO J, RODRIGUEZ N, FORERO J, RINCON J. *Genética Molecular: Aplicada al mejoramiento animal.* 1 Edi. Medellín; 2011.

ETHERTON T, BAUMAN D. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev.* 1998; 78 (3): 745 - 61.

FALAKI M, GENGLER N, SNEYERS M, PRANDI A, MASSART S, FORMIGONI A, et al. Relationships of polymorphism for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *J Dairy Sci.* 1996; 79 (8): 1446 – 1453.

FAURE R, MORALES C. La pubertad de la hembra bovina: I. aspectos fisiológicos. *Rev Salud Anim.* 2003; 25 (1): 13 - 19.

GE W, DAVIS M, HINES H. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin like growth factor I concentration and growth traits in angus cattle. *J Anim Sci.* 2003; 81 (3): 641 - 648.

GORBANI A, VAEZ R, BONYADI M, AMIRINIA C. A MspI PCR-RFLP within bovin growth hormone gene and its association with sperm quality traits in Iranian Holstein Bulls. *Afr J Biotechnol.* 2009; 8 (19): 4811 - 4816

GORDON F, QUICK P, EWIN R, DONELSON E, MAURER A. Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene. *Mol Cell Endocrinol.* 1983; 33 (1): 81 – 95.

HOJ S, FREDHOLM M, LARSEN N, NIELSEN V. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. *Anim Genet.* 1993; 24 (2): 91- 96.

KERRY L, HARVEY S. Growth hormone roles in male reproduction. *Endocrine.* 2000; 13 (3): 243 – 250.

KHATIB H, MALTECCA C, MONSON R, SCHUTZKUS V, WANG X, RUTLEDGE J. The fibroblast growth factor 2 gene is associated with embryonic mortality in cattle. *J Anim Sci.* 2008; 86: 2063 – 2067.

LAGZIEL A, LIPKIN E, SOLLER M. Association between SSCP haplotypes at the bovine growth hormone gene and milk protein percentage. *Genetics*. 1996; 142 (3): 945 - 51.

LAGZIEL A, DENISE S, HANOTTE O, DHARA S, GLAZKO V, RUSSO V, et al. Geographic and breed distribution of an MspI PCR-RFLP in the bovine growth hormone (BGH) gen. *Anim genet*. 2000; 31: 210 - 213.

LECHNIAK D, MACHNIK G, SZYDLOWSKI M, SWITONSKI M . Growth hormone gene polymorphism and reproductive performance of AI bulls. *Theriogenology*. 1999; 52 (7): 1145 - 1152.

LEE B, LIN G, CROOKER B, MURTAUGH M, HANSEN L, CHESTER JONES H. Association of somatotropin gene polymorphism at the 5th exon with selection for milk yield in holstein cows. *Domest Anim Endocrin*. 1993; 13 (4): 376 - 381

LINCOLN D, SINOWATZ F, HIFNAWI E, HUGHES R, WATERS M. Evidence of a direct role for growth hormone (GH) in mammary gland proliferation and lactation. *Anat Histol Embryol*. 1995; 24 (2): 107 - 115.

LINGAPPA V, DEVILLERS A, BLOBEL G. Nascent prehormones are intermediates in the biosynthesis of authentic bovine pituitary growth hormone and prolactin. *P Natl A Sci*. 1977; 74 (6): 2432 - 2436.

LOPEZ A, ECHEVERRI J, GUTIERREZ C, VASQUEZ J, BARRIENTOS S, CAMARGO O et al. *Marcadores Moleculares en producción bovina*. 1.ed. Medellín; 2011.

LUCY M, HAUSER S, EPPARD P, KRIVI G, CLARK J, BAUMAN D. Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. *Domest Anim Endocrinol*. 1993; 10(4): 325-333.

LUCY M. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reprod Domest Anim*. 2008; 43 Suppl 2: 31 - 39.

MATTOS K, LAMA S, MARTINEZ M , FERREIRA A. Association of bGH and pit-1 gene variants with milk production traits in dairy Gyr bulls. *Pesq Agropec Bras.* 2004; 39 (2): 147 - 150.

MITRA A, SCHLEE P, BALAKRISHNAN C, PIRCHNER F. Polymorphism at growth hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo. *J Anim Breed Genet.* 1995; 112 (1-6): 71 – 74.

MONTALDO H, MESA A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Electron J Biotechno.* 1998; 1(2): 1 - 7.

MOODY D, POMP D, NEWMAN S, MACNEIL D. Characterization of DNA polymorphisms in three populations of hereford cattle and their associations with growth and maternal EPD in line 1 herefords. *J Anim Sci.* 1996; 74 (8): 1784 - 1793.

MULLEN M, BERRY D, HOWARD D, DISKIN M, LYNCH C , BERKOWICZ E ,et al. Associations between novel single nucleotide polymorphisms in the *Bos taurus* growth hormone gene and performance traits in Holstein-Frisian dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2010; 93 (12): 5959 - 5969.

NARANJO J, POSSO A, CARDENAS H, MUÑOZ J. Detección de variantes alelicas de la kappa caseína en bovinos Harton del Valle. *Acta Agro.* 2007; 56 (1): 26 – 32.

NEIMANN A, ROBERTSON A. The association between blood groups and several production characteristic in three Danish cattle breeds . *Acta Agric Scand.* 1961; 11: 163 - 196.

OUTWATER J, NICHOLSON A, BARNARD N. Dairy products and breast cáncer: IGF I, estrogen and BGH hypothesis. *Med hypotheses* 1997; 48 (6):453 - 461.

PAUL K, BACHELOT A, KEDZIA C, HENNIGHAUSEN L, ORMANNDY C, KOPCHICK J, BINART N. The role of prolactin and growth hormone in mammary gland development. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 197 (1-2): 127 - 131.

PAWAR R, TAJANE K, JOSHI C, RANK D, BRAMKSHTRI B. Growth hormone gene polymorphism and its association with lactation yield in dairy cattle. *Indian J Anim Sci.* 2007; 77 (9): 884 - 888.

PEREIRA A, MAURÍCIO M, HENRIQUE N, LUCIANA C. Association of GH and IGF-1 polymorphisms with growth traits in a synthetic beef cattle breed. *Genet Mol Biol.* 2005; 28 (2): 230 - 236.

ROCHA J, BAKER J, WOMACK J, SANDERS J, TAYLOR J. Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. *J Anim Sci.* 1992; 70: 3360 – 3370.

SCHAMS D, BERISHA B, KOSMANN M, EINSPANIER R, AMSELGRUBER W. Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF- binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals. *Domest Anim Endocrinol.* 1999; 17 (2-3): 279 – 285.

SECCHI C, BORROMEO V. Structure and function of bovine growth hormone Bovine growth hormone as an experimental model for studies of protein-protein interactions. *J Chromatography B.* 1997; 688 (2): 161 - 167.

SODHI M, MUKESH M, PRAKASH B, MISHRA B, SOBTI R. MspI Allelic Pattern of Bovine Growth Hormone Gene in Indian Zebu Cattle (*Bos indicus*) Breeds. *Biochem Genet.* 2007; 45 (1-2): 145 - 153.

UFFO O, SANZ A, SOSA A, MARTÍNEZ S. Identificación del polimorfismo del gen que codifica para la hormona del crecimiento bovina mediante PCR y detección de RFLP. *Rev Salud Anim.* 2002; 24 (1): 27 - 31.

UNANIAN M, BARRETO C, FREITAS A, CORDEIRO C, JOSAHKIAN L. Associação do Polimorfismo do Gene do Hormônio de Crescimento com a Característica Peso em Bovinos da Raça Nelore. *Rev Bras Zootec.* 2000; 29 (5) : 1380 - 1386.

VUKASINOVIC N. Association of growth hormone loci with milk yield traits in Holstein Bulls. *J Dairy Sci.* 1997; 82 (4): 788 - 794.

YAO J, AGGREY S, ZADWORNÝ D, HAYES J, KUHNLEIN U. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holstein. *Genetics.* 1996; 144 (4): 1809 - 1816.

ZHANG H, BROWN D, DENISE S. Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the bovine somatotropin gene. *J Anim Sci.* 1993; 71: 2276.

ZHOU G, JIN H, LIU C, GUO S, ZHU Q, WU Y. Association of genetic polymorphism in GH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows. *J Biosci.* 2005; 30 (2); 595 – 59.

ZWIERZCHOWSKI L, KRZYZEWSKI J, STRZALKOWSKA N, SIADKOWSKA E, RYNIEWICZ Z. Effects of polymorphism of growth hormone (GH), Pit-1, and Leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of polish black-and-white cows. *Anim Sci P.* 2002; 20: 213 - 227.

Capítulo 2

Asociación del polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona de crecimiento bovino (BGH) con parámetros reproductivos en ganado Holstein del departamento de Antioquia

Association between intron 3 of the gene of bovine growth hormone (BGH), with reproductive parameters in Holstein cattle from Antioquia.

Artículo en proceso de sometimiento a la Revista MVZ Córdoba.

2.1 Resumen

Objetivo. Determinar la asociación del polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona de crecimiento bovino (BGH) con las edades al primer servicio, primer parto, primer servicio posparto y segundo parto en una población de vacas Holstein del departamento de Antioquia. **Materiales y métodos.** El estudio se realizó con 460 vacas Holstein ubicadas en 8 hatos del departamento de Antioquia. La genotipificación se llevó a cabo usando la técnica de PCR-RFLP con DNA extraído de sangre periférica mediante la técnica de salting out. La información fenotípica utilizada fue recopilada durante 4 años, a partir de un programa de control de producción lechera vigente en los hatos. Para determinar la asociación entre las características y el polimorfismo del gen, se realizaron análisis estadísticos paramétricos como modelos lineales generalizados y análisis de regresión lineal. **Resultados.** Las frecuencias alélicas para los alelos (+) y (-) fueron 0.91 y 0.09 respectivamente. Las frecuencias genotípicas fueron 0.77, 0.2 y 0.03 para (+/+), (+/-) y (-/-) respectivamente. Se presentaron diferencias significativas entre las medias de la edad al primer servicio, la edad al primer parto, edad al primer servicio postparto y edad al segundo parto. Para todas las características el genotipo (-/-) mostró inferioridad reproductiva, al presentar edades más tardías en cada uno de los eventos. **Conclusión.** Estos resultados sugieren que el polimorfismo del intrón 3 del gen BGH, está asociado con características de tipo reproductivo, facilitando la implementación de un programa de selección de individuos con genotipos favorables, para su utilización en programas de mejoramiento genético animal.

Palabras claves: PCR-RFLP, marcadores moleculares, reproducción animal.

2.2 Abstract

Objective. To determine the association of the polymorphism of intron 3 of the gene for bovine growth hormone (BGH), with the next characters: age at first service, first birth, first and second postpartum service delivery in a population of Holstein cows in the Antioquia state. **Materials and methods.** The study was conducted with 460 Holstein cows in 8 herds located in the Antioquia state. Genotyping was performed using PCR-RFLP with DNA extracted from peripheral blood by salting out technique. Used phenotypic information was collected for 4 years, from a production control program in the dairy herds. To determine the association between the characteristics and gene polymorphism, parametric statistical analyzes were performed as generalized linear models and linear regression analysis. **Results.** Frequencies of the alleles (+) and (-) were 0.91 and 0.09 respectively. The genotype frequencies were 0.77, 0.2 and 0.03 for (+/+), (+/-) and (-/-) respectively. There were significant differences between the mean of age at first service, age at first birth, age at first postpartum service and age at second birth. For all of the characteristics the genotype (-/-) showing greater ages for each event. **Conclusion.** These results suggest that the polymorphism of intron 3 of the BGH gene is associated with reproductive traits, facilitating the selection of individuals with favorable genotypes for use in breeding programs

Keywords: PCR-RFLP, molecular markers, animal reproduction.

2.3 Introducción

En los hatos lecheros especializados, la eficiencia reproductiva tiene una influencia directa sobre la productividad. Sin un desempeño reproductivo eficiente, la producción de leche se ve fuertemente afectada y por tanto, la rentabilidad económica del hato. La fertilidad de la vaca se encuentra afectada por muchos factores, la edad a la pubertad del animal tiene una influencia muy fuerte y es trascendental debido a que las altas edades

al inicio de la reproducción y al primer parto se reflejan en una baja eficiencia reproductiva (Faure y Morales, 2003).

El atraso en la edad de servicio o parto de cada vaca o aun cada vaca eliminada por infertilidad, afecta el rendimiento económico del hato. Cuando una novilla se demora en entrar al programa reproductivo o una vaca se demora en retornar al celo después del parto, se generan gastos por el período adicional no lactante y alargamiento del intervalo generacional (Faure y Morales, 2003).

En contraste la reducción del periodo de levante de las novillas y un crecimiento rápido, que las acerque en menor tiempo a la etapa reproductiva, da como resultado más partos durante la vida del animal y más producción durante su vida. Es esencial considerar los factores que influyen sobre el conjunto de estos parámetros. El gen de la hormona del crecimiento bovino (BGH) presenta polimorfismos que influyen de manera diferente estas características (Zhou et al., 2005) y juega un papel clave en la regulación del crecimiento y el desarrollo influenciando de forma indirecta la eficiencia reproductiva del bovino (Hossner et al., 1997; Breier, 1999; Pereira et al., 2005; Zhou et al., 2005; Curi et al., 2005; Kanoth et al., 2008).

Los efectos de la BGH sobre el crecimiento, se observan en varios tejidos, incluyendo huesos, músculos y tejido adiposo. Estos efectos resultan tanto de la acción directa de la BGH en la partición de nutrientes y en la multiplicación celular, como en la acción mediada por el factor de crecimiento insulinoide tipo 1, de estimular la proliferación celular y los procesos metabólicos, asociada a la deposición de proteínas (An et al., 2010;). Además se han reportado relaciones significativas entre las concentraciones de BGH, con el periodo postparto y consecuentemente con la fertilidad de la vaca (Patton et al., 2007; Lucy, 2008).

El interés principal con el análisis de esta asociación, esta dado por la determinación de la influencia de las variantes genéticas de la hormona del crecimiento sobre el alcance de un estado reproductivo activo más temprano y explorar el efecto que tienen estas variantes sobre esas características. El objetivo de esta investigación es determinar la asociación del polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona de crecimiento bovino

(BGH), con las edades al primer servicio, primer parto, primer servicio posparto y segundo parto en una población de vacas Holstein del departamento de Antioquia.

2.4 Materiales y métodos

2.4.1 Áreas y población en estudio.

Se utilizaron 460 animales de la raza Holstein pertenecientes a 8 hatos lecheros ubicados en el trópico alto Antioqueño, zonas norte y oriente del departamento, en los municipios de San Pedro de los Milagros (Altura 2.475 m.s.n.m; T° 14°C), Belmira (Altura 2.550 m.s.n.m; T° 14°C) y Medellín corregimiento Santa Elena (altura 2500 m.s.n.m; T° 17°C).

2.4.2 Extracción de DNA y determinación de las variantes genotípicas

Para la determinación de las variantes genotípicas, se extrajo sangre de la vena coccígea y se realizó la extracción del DNA, mediante la técnica de salting out descrita por Miller et al. (1988). Sólo el ADN genómico con una pureza ideal entre 1.8-2.0 se consideró para los estudios a realizar.

Se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos, de 20 pares de bases **F** 5' CCCACGGGCAAGAATGAGGC 3', **R** 5' TGAGGAACTGCAGGGGCCCA 3', que permitieron amplificar el fragmento de 329 pb que presenta el sitio de restricción para la endonucleasa MspI (Dybus, 2002).

Se realizó una amplificación por PCR para la región específica, usando un volumen final de 25 µL que contenía 2.5 µL buffer PCR 10X (1.0 -1.5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl, pH de 8.3), 0.2 µM de cebadores; 0.4 mM de cada dNTPs, 2mM de MgCl₂, 1 unidad de taq polimerasa (Bioline ®) y 30-60 ng de DNA genómico.

La PCR se realizó en un termociclador (Biometra®). Las condiciones para la amplificación de la región específica del gen BGH fueron una desnaturalización con un

calentamiento inicial de cinco minutos a 94°C, seguido por 39 ciclos de una desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento de cebadores (annealing) a 55°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto, para finalizar un paso de extensión de 3 minutos a 72°C para terminar la reacción (Dybus, 2002). La temperatura de alineamiento utilizada se determinó siguiendo la recomendación de los distribuidores de los cebadores y mediante diferentes ensayos que arrojaron mayor eficiencia de alineamiento a la temperatura citada (55°C) (Dybus, 2002). Como control positivo de todas las reacciones se realizó la amplificación de muestras que fueron previamente evaluadas y como control negativo reacciones en ausencia de DNA. Las variantes genóticas fueron determinadas mediante la utilización de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), usando la enzima de restricción MspI, se usó un volumen final de 20 µl que contiene 5 µl del producto de PCR, 2 µl de buffer Tango 1X, 12.5 µl de agua ultra pura, los cuales fueron sometidos a digestión por 5 unidades de enzima de restricción MspI durante tres horas a 37°C. El producto se observó por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y tinción con bromuro de etidio. El patrón de restricción esperado para el genotipo (-/-) fue un fragmento de 329pb, para el genotipo (+/-) tres fragmentos (329pb, 224pb y 105pb) y para el genotipo (+/+) dos fragmentos (224pb y 105pb).

2.4.3 Estimación de las frecuencias alélicas.

La frecuencia de los diferentes alelos se estimó determinando la proporción de cada forma del gen entre el número de copias totales de la población en estudio. Se identificaron los homocigotos (dos copias del mismo alelo) y los heterocigotos (una copia de cada alelo), y se calculó la frecuencia (F) de cada alelo contando los homocigotos y añadiendo la mitad de los heterocigotos, con el método descrito por Hartl (2000).

Frecuencia total (p) de los alelos 1 en la población:

$$p = F_{a/a} + \frac{1}{2} F_{a/b}$$

Frecuencia total (q) de los alelos 2 en la población:

$q = Fb/b + 1/2Fa/b$, donde;

F a/a y F b/b = Homocigóticos para cada uno de los alelos

F a/b = Heterocigótico.

2.4.4 Análisis estadístico.

Para determinar la asociación de cada una de las características con el genotipo para BGH, se llevó a cabo el ajuste de varios modelos lineales generalizados basados en las fuentes de variación conocidas para cada una de las variables dependientes (Edad al primer servicio, edad al primer parto, edad al primer servicio postparto y edad al segundo parto). El análisis de medias de Tukey fue utilizado para determinar las diferencias entre las medias para cada uno de los niveles de los efectos fijos incluidos en los modelos. Se utilizó el paquete estadístico SAS v9.2., para todos los análisis (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

El modelo general de efectos fijos llevado a cabo fue el siguiente:

$$Y_{ijklmnopq} = \mu + G_i + H_j + AN_k + MN_l + (MN*AN)_m + (H*AN)_n + (H*MN)_o + (H*MN*AN)_p + (H*G)_q + e_{ijklmnopq}$$

Dónde:

$Y_{ijklmnopq}$ = Edad al primer servicio, edad al primer parto, edad al primer servicio postparto o edad al segundo parto, del individuo X, portador del genotipo i, ubicado en el hato j, con año de nacimiento k y mes de nacimiento l.

μ = Media para la característica

G_i = Efecto fijo del Genotipo para BGH (i= 1...3)

H_j = Efecto fijo del hato (j = 1...8)

AN_k = Efecto fijo del Año de Nacimiento (k=1...15)

MN_l = Efecto fijo del mes de Nacimiento (l=1...12).

$(MN*AN)_m=$	Efecto fijo de la interacción entre el mes de nacimiento y el año de nacimiento(m=1...86)
$(H*AN)_n=$	Efecto fijo de la interacción entre el hato y el año de nacimiento (n=1...46)
$(H*MN)_o=$	Efecto fijo de la interacción entre el hato y el mes de nacimiento (o=1...68)
$(H*MN*AN)_p=$	Efecto fijo de la interacción entre el hato, el mes de nacimiento y el año de nacimiento (p=1...41)
$(H*G)_q=$	Efecto fijo de la interacción entre el hato y el genotipo (q=1...13)
$e_{ijklmnopq} =$	Error experimental.

Se realizó un análisis de regresión lineal simple, para determinar el efecto de sustitución alélica, con cada una de las variables en estudio, para este fin, el genotipo se convirtió a una escala cuantitativa 0, 1 y 2 para (-/-), (+/-) y (+/+) respectivamente.

El modelo de regresión lineal utilizado fue el siguiente:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + e_i$$

Dónde:

Y_i : Valor de la variable dependiente (Edad al primer servicio, edad al primer parto, edad al primer servicio postparto y edad al segundo parto) en función del número de alelos +

$\beta_0 =$ Intercepto

$\beta_1 =$ Coeficiente de regresión lineal estimado para el alelo de sustitución (+)

X_i : Número de alelos + en el individuo i. (0, 1, 2)

e_i : error experimental

2.5 Resultados

2.5.1 Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen de la hormona de crecimiento (BGH)

Se amplificó un fragmento de 329pb a partir del ADN de 408 animales. El análisis de los fragmentos de restricción usando la enzima MspI, originó 2 patrones de restricción; 329pb, correspondiente al alelo (-) y 224 y 105pb, correspondiente al alelo (+). Las frecuencias alélicas de (+) y (-) fueron de 0.91 y 0.09 respectivamente. Las frecuencias genotípicas fueron 0.77, 0.2 y 0.03 para (+/+), (+/-) y (-/-) respectivamente.

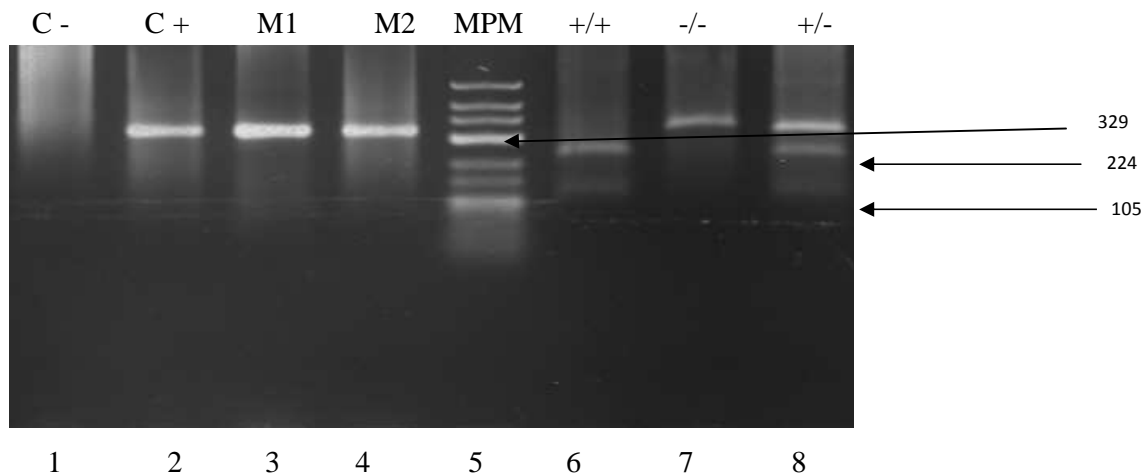


Figura 2.2 Fragmento amplificado y patrones de restricción para el gen de la hormona de crecimiento bovino (carriles. 1 control negativo, 2 control positivo, 3 fragmento amplificado muestra 1 329bp, 4 fragmento amplificado muestra 2 329bp, 5 marcador de peso molecular MPM, 6 patrón de restricción genotipo +/+, 7 patrón de restricción genotipo -/-, 8, patrón de restricción genotipo +/-).

2.5.2 Análisis descriptivo

El promedio para la edad al primer servicio fue de 589 ± 91.17 días. Para la edad al primer parto se obtuvo un promedio de 911 ± 126.2 días, para el primer servicio postparto de 1013 ± 142.57 días y para el segundo parto de 1314 ± 138.01 días. Todas las

características tuvieron una variación baja, siendo dentro de éstas la edad al primer servicio la de más alto coeficiente de variación 15.4%. Los valores promedio de estas características son altos con respecto a las metas reproductivas que deben tener los sistemas de producción lechera eficientes. En la tabla 2.1 se resume la estadística descriptiva para todas las características.

Tabla 2.1 Media, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) para la edad al primer servicio, edad al primer parto, edad al primer servicio postparto y edad al segundo parto en vacas Holstein del departamento de Antioquia.

Característica	N	Media	DE	CV
Edad al primer servicio (días)	433	589	91.1	15.4 %
Edad al primer parto (días)	448	911	126.2	13.8 %
Edad al primer servicio postparto (días)	391	1013	142.5	14.0 %
Edad al segundo parto (días)	453	1314	138.0	10.5 %

2.5.3 Efecto del genotipo sobre las edades de los eventos reproductivos

El genotipo tuvo un efecto altamente significativo ($p < 0.01$), sobre la edad al primer servicio; el modelo, presentó un coeficiente de determinación de 0.88, indicando que el hato, el año de nacimiento, mes de nacimiento, la interacción entre el mes y año de nacimiento, entre el hato y año de nacimiento, hato y mes de nacimiento y la interacción entre el hato el mes y el año de nacimiento, explicaron en un 88% la variación de la característica. El análisis de medias de Tukey que se realizó posteriormente, mostró como las novillas con genotipo (-/-) tardaron 69 días más para su primer servicio que las novillas con genotipo (+/+). De la misma forma los individuos (+/-) se demoraron 13 días más que las (+/+). Los animales con genotipo (-/-) presentaron menor rendimiento ya que tuvieron su primer servicio a edad más tardía, estas diferencias son presentadas en la Tabla 2.2.

El genotipo tuvo un efecto altamente significativo ($P < 0.01$) sobre la edad al primer parto y al primer servicio postparto, el modelo, presentó un coeficiente de determinación de 0.81 y 0.83 respectivamente, indicando que los efectos incluidos en el modelo explicaron en un 81% la variación en la edad al primer parto y en un 83% la variación en la edad al primer servicio postparto. Un análisis de medias de Tukey llevado a cabo posteriormente, mostró diferencias significativas ($p < 0.05$), denotando el genotipo (-/-) como el menos favorable, mostrando la edad más tardía para las dos características. El análisis de medias de los genotipos (+/+) y (+/-) no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$). Tabla 2.2.

El genotipo tuvo un efecto altamente significativo ($P < 0.01$) sobre la edad al segundo parto, el modelo mostró un coeficiente de determinación de 0.79, indicando que los efectos del hato, el año de nacimiento, mes de nacimiento, la interacción entre el mes y año de nacimiento, hato y año de nacimiento, hato y mes de nacimiento y la interacción entre el hato el mes y el año de nacimiento explicaron en un 79% la variación de esta característica. El análisis de medias de Tukey, mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las medias, denotando el genotipo (-/-) como el menos favorable para la edad al segundo parto con un promedio de días mayor. El análisis de medias de los genotipos (+/+) y (+/-) no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$), Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Análisis de medias de Tukey para la edad al primer servicio, primer parto, primer servicio postparto y segundo parto, en vacas Holstein del departamento de Antioquia.

Genotipo	Edad al primer servicio (días)	Edad al primer parto (días)	Edad al primer servicio postparto (días)	Edad al segundo parto (días)
(+/+)	577.4 ^a	905.0 ^a	998.2 ^a	1304.6 ^a
(+/-)	590.3 ^b	905.3 ^a	1000.1 ^a	1305.8 ^a
(-/-)	646.3 ^c	967.3 ^b	1040.4 ^b	1375.3 ^b

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa

2.5.4 Efecto de sustitución alélica del polimorfismo del gen BGH sobre las edades a las cuales se presentan algunos eventos reproductivos

Para la edad al primer servicio se encontró un coeficiente de regresión (β) de -20.3, indicando que por cada alelo (+) que porte el individuo, la edad a el primer servicio disminuye en 20 días; la edad al primer parto tuvo un coeficiente de regresión (β) de -11.67, es decir, por cada alelo (+) la edad al primer parto disminuye en 11 días. Para la edad del primer servicio postparto el (β) indica que por cada alelo (+) la edad disminuye en 8 días, y el β para la edad al segundo parto fue de -15.83 indicando que por cada alelo (+) la edad al segundo parto disminuye en 15 días. Los coeficientes de regresión de cada una de las características son mostrados en la Tabla 2.3.

El coeficiente de regresión estimado para la edad al primer servicio y segundo parto, fueron altamente significativas ($P < 0.01$), el coeficiente de regresión para la edad al primer parto fue significativo ($P < 0.05$) y la edad al primer servicio postparto no fue estadísticamente significativo ($P > 0.05$).

Tabla 2.3 Análisis de regresión para las características edad al primer servicio, primer parto, primer servicio postparto y segundo parto

Característica	Intercepto (I)	Beta (β)	Error Estándar β
Edad al primer servicio(días)	617.21	-20.3	3.09
Edad al primer parto(días)	927.37	-11.67	4.4
Edad al primer servicio postparto (días)	1015.05	-8.5	4.9
Edad al segundo parto (días)	1335.04	-15.83	5.2

2.6 Discusión

Las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas en el presente trabajo coinciden con las reportadas por Gorbani et al. (2009), en una población de 183 animales de raza Holstein, donde encontraron frecuencias de 0.787, 0.191 y 0.022 para los genotipos (+/+), (+/-) y (-/-) respectivamente, y 0.883 y 0.117 para los alelos (+) y (-) respectivamente.

Mullen et al. (2011), encontraron asociación entre tres de seis polimorfismos, situados en el primer exón (región 5') del gen GH. Estos nuevos SNP encontrados, se asociaron con la tasa de preñez al primer servicio, sin embargo no se realizaron asociaciones con la edad a la cual ocurre dicho evento. Reportes generados por Katalin et al. (2006) mencionan que el polimorfismo que es reconocido por la enzima AluI de la región del exón 5 posición 127, designando los alelos L y V, no están asociados con la edad al primer parto en vacas Holstein.

Para el polimorfismo del presente estudio no se encontraron reportes de asociaciones con las características como edad al primer servicio, edad al primer parto, edad primer servicio postparto y segundo parto, por lo que este estudio se convierte en pionero.

La edad al primer servicio en las novillas es un importante parámetro de eficiencia reproductiva, la reducción del periodo de levante y una entrada rápida al programa de reproducción genera mayor rendimiento económico, una edad tardía en la incorporación a la primera etapa reproductiva se refleja en una baja eficiencia reproductiva en el hato (Faure y Morales, 2003). Para el caso de esta investigación, se puede decir que la edad al primer servicio es alta comparada con la de algunos otros reportes y debe ser materia de trabajo por parte de los productores e investigadores en el área de reproducción y genética.

La edad al primer parto es otro factor importante en la vida productiva del animal, edades avanzadas en las que ocurre este evento repercute en una menor producción láctea y mayor consumo de alimento derivando en un mayor costo inicial de crianza

(Orrego et al., 2003). Establecer la edad alrededor de la cual las novillas están pariendo evalúa la velocidad de crecimiento desde el nacimiento hasta el momento en que pueden aportar leche o terneros al sistema para retornar la inversión de su levante. La edad al primer parto en este estudio fue también alta y por ende, debe ser materia de trabajo por parte de los productores e investigadores.

El genotipo (-/-) es el menos favorable, ya que retrasa la edad al primer servicio, así como también la edad al primer parto, servicio postparto y segundo parto. Aunque la baja frecuencia del genotipo (-/-), significa una limitación al realizar análisis de asociación, el polimorfismo del intrón 3 de la BGH mostró resultados significativos para todas las características.

El mayor efecto del genotipo del polimorfismo de la BGH se presentó al evaluarse la edad al primer servicio, por cada alelo (+), el primer servicio se presentó 20 días más rápido, este efecto disminuyó en la edad al primer parto en 11 días y para la edad al segundo parto en 15 días. La disminución en cada uno de estos parámetros es importante en el desempeño reproductivo del hato dando como resultado una vida útil productiva más prolongada (Villalobos et al., 2005, Marini et al., 2007). Es así como la asociación de este polimorfismo de la BHG puede utilizarse como ayuda para seleccionar animales que tiendan a entrar a etapas reproductivas tempranas disminuyendo pérdidas económicas que se generan de la cría de los animales hasta la madurez (Arauna et al., 2004).

El hallazgo de que el genotipo +/+ tiene influencia sobre la edad al primer servicio repercute en la reducción del periodo de levante, lo que indica menor edad al segundo parto y una vida productiva alta de estos animales portadores. La entrada temprana a los programas de reproducción genera mayor rendimiento económico y menor consumo de alimento que se deriva en un menor costo de crianza, por lo cual esta información en términos productivos y reproductivos es un aporte importante para los programas de selección.

2.7 Conclusiones

Este es un estudio pionero en asociar los polimorfismos del intrón 3 del gen BGH con características reproductivas en vacas lecheras. Estos resultados sugieren que el polimorfismo del intrón 3 de la BGH está asociado con las edades al primer servicio, primer parto, primer servicio posparto y segundo parto facilitando la selección de individuos con genotipos favorables para su utilización en programas de mejoramiento genético.

La baja frecuencia del genotipo -/- es limitante para determinar las asociaciones de los genotipos con cada una de las características incluidas en este trabajo, por esto se recomienda aumentar el tamaño de la muestra para futuros estudios y conseguir mayor confiabilidad en los resultados.

Este es el primer reporte que evalúa la asociación de este tipo de características con el gen de la hormona de crecimiento bovino en ganado Holstein de trópico alto colombiano, los cuales servirán de base para futuras investigaciones.

Se encontró que el genotipo +/+ es el más deseado para la disminución de la edad al primer servicio, primer parto, primer servicio postparto y segundo parto; teniendo el genotipo mayor efecto en la edad al primer servicio.

2.8 Referencias

AN P, HOU J, WANG L, LI G, WANG J , SONG Y, et al. Polymorphisms of the growth hormone gene and their effect on growth traits in Chinese goats. *Meat Sci.* 2010; 86 (3): 758 – 763.

ARAUNA P, CHAKRAVARTY A, BHATTACHARYA T, JOSHI B, ARJAVA S. Detection of Polymorphism of Growth Hormone Gene for the Analysis of Relationship between Allele Type and Growth Traits in Karan Fries Cattle. *J Anim Sci.* 2004; 17 (10): 1334 - 1337

BREIER B. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotropic axis. *Domest Anim Endocrinol.* 1999; 17 (2-3): 209 - 218.

CURI A, OLIVEIRA N, SILVEIRA C, LOPES R. Association between IGF-I, IGF-IR and GHRH gene polymorphisms and growth and carcass traits in beef cattle. *Livest Prod Sci.* 2005; 94 (3): 159 - 167.

DYBUS A. Associations of growth (GH) and Prolactin (PRL) genes polymorphisms with milk production traits in Polish Black and White cattle. *Anim Sci P.* 2002; 20 (4): 203 - 212.

FAURE R, MORALES C. La pubertad de la hembra bovina: I. aspectos fisiológicos. *Rev Salud Anim.* 2003; 25 (1): 13 - 19.

GORBANI A, VAEZ T, BONYADI M, AMIRINIA C. A MspI PCR-RFLP within bovin growth hormone gene and its association with sperm quality traits in Iranian Holstein bulls. *Afr J Biotechnol.* 2009; 8 (19); 4811 - 4816.

HARTL D. A primer of populations Genetics. En: Sinauer Associates, Inc. Publishers. 3 edition. Sunderland, Mássachussets. U.S.A. 2000. p. 26 - 31.

HOSSNER K, MCCUSKER R, DODSON M. Insulin-like growth factors and their binding proteins in domestic animals. *Anim Sci.* 1997; 64: 1- 15.

KANOTH K, KOUNO S, OKAZAKI A, SUZUKI K, OBARA Y. Interaction of GH polymorphism with body weight and endocrine functions in Japanese black calves. *Domest Anim Endocrinol.* 2008; 34 (1): 25 - 30.

KATALIN K, JÓZSEF V, ATTILA Z, ISTVÁN G, LÁSZLÓ F. Associations between the AluI polymorphism of growth hormone gene and production and reproduction traits in a Hungarian Holstein-Friesian bull dam population. *Arch Tierz.* 2006; 49 (3): 236 - 249.

LUCY M. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reprod Domest Anim.* 2008; 43 (2): 31 - 39.

MARINI P, CHARMANDARIAN D, MASSO R. Desempeño productivo y reproductivo de vacas de diferentes edades al primer parto en sistemas a pastoreo. *Sitio Argentino de Producción Animal.* Cusco, Perú, 2007.

MILLER S, DYKES D, POLESKY H. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 1988; 16: 1215.

MULLEN P, LYNCH C, WATERS S, HOWARD D, O'BOYLE P, KENNY D, et al. Single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and insulin-like growth factor-1 genes are associated with milk production, body condition score and fertility traits in dairy cows. *Genet Mol Res.* 2011; 10 (3): 1819 - 1830.

ORREGO J, ALFREDO D, ECHAVARRIA L. Vida productiva y principales causas de descartes de vacas Holstein en la cuenca de lima. *Rev int vet Perú.* 2003; (14): 68 - 73.

PATTON J, KENNY D, MCNAMARA S, MEE J, O'MARA F, DISKIN M, et al. Relationships among milk production, energy balance, plasma analytes, and reproduction in Holstein-Friesian cows. *J Dairy Sci.* 2007; 90 (2): 649 - 658.

PEREIRA A, MAURÍCIO M, HENRIQUE N, LUCIANA C. Association of GH and IGF-1 polymorphisms with growth traits in a synthetic beef cattle breed. *Genet Mol Biol.* 2005; 28 (2): 230 - 236.

SAS 9.2 SQL Procedure User's Guide. SAS Institute., Inc., Cary, N.C, USA, 2009.

VILLALOBOS D, ARMANDO M. Manejo de las novillas de reemplazo. Manual de Ganadería Doble Propósito [Manual]. Unidad de Investigación en Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, 2005.

ZHOU G, JIN H, LIU C, GUO S, ZHU Q, WU Y. Association of genetic polymorphism in GH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows. J Biosci. 2005; 30 (5): 595 - 598.

Capítulo 3

Asociación del polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona de crecimiento bovino con características de crecimiento en novillas Holstein del departamento de Antioquia

Association between polymorphism at the intron 3 of bovine growth hormone gene and growth traits in Holstein heifers of Antioquia department

Artículo en proceso de sometimiento en Revista Facultad Nacional de Agronomía
Medellín

3.1 Resumen

Objetivo. Determinar la asociación del polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona de crecimiento bovino (BGH), con parámetros de crecimiento relacionados con el inicio de la vida productiva en novillas Holstein. **Materiales y métodos.** La investigación se realizó con 480 novillas Holstein, ubicadas en 8 hatos de 3 Municipios del departamento de Antioquia. La información fenotípica utilizada correspondió a la capturada históricamente en cada uno de los hatos y se complementó con información obtenida mediante visitas bimensuales llevadas a cabo a los hatos durante un periodo de 24 meses. La genotipificación se llevó a cabo usando la técnica de PCR-RFLP con DNA extraído de sangre periférica mediante la técnica de salting out. Para la asociación se realizaron análisis estadísticos con métodos paramétricos. **Resultados.** Las frecuencias alélicas para los alelos (+) y (-) fueron 0.91 y 0.09 respectivamente. Las frecuencias genotípicas fueron 0.77, 0.2 y 0.03 para (+/+), (+/-) y (-/-) respectivamente. Se encontró asociación entre el genotipo y el peso al primer servicio y al primer parto ($P < 0.01$). Los coeficientes de regresión para ambas características fueron significativos; indicando que por cada alelo (+) el peso al primer servicio y al primer parto disminuye en 9.24Kg y 16.07Kg respectivamente. **Conclusiones.** Los resultados indican la asociación del polimorfismo del intrón 3 del gen de la BGH con el peso al primer servicio y primer parto, facilitando la selección de animales a partir de estos genotipos, para su utilización en programas de mejoramiento genético.

Palabras clave: PCR-RFLP, marcadores moleculares, producción animal, crecimiento.

3.2 Abstract

Objective. To determine the association between the polymorphism of intron 3 of the gene for bovine growth hormone (BGH) and the growth parameters related to the onset of productive life in Holstein heifers. **Materials and methods.** The research was conducted with 480 Holstein heifers, which are in 8 herds from 3 Municipalities of Antioquia state. The phenotypic data used corresponded to the historically captured in each of the herds and was complemented with information obtained through bi-monthly visits conducted at the herds during a period of 24 months. Genotyping was performed using PCR-RFLP with DNA extracted from peripheral blood through salting out technique. To the association were performed statistical analyzes using parametric methods. **Results.** Allele frequencies for the alleles (+) and (-) were 0.91 and 0.09 respectively. The genotypic frequencies were 0.77, 0.2 and 0.03 for (+/+), (+/-) and (-/-) respectively. There was an association between the genotype and weight at first breeding and first calving ($P < 0.01$). The regression coefficients were significant for both traits, indicating that for each allele (+) weight at first breeding and first calving decreases 9.24Kg and 16.07Kg respectively. **Conclusions.** The results indicate that exist association of polymorphism in intron 3 of the BGH gene with both weight at first breeding and first calving, facilitating the selection of animals from these genotypes for use in breeding programs

Keywords: PCR-RFLP, molecular markers, animal production, growth.

3.3 Introducción

En las ganaderías de leche especializada obtener una alta eficiencia biológica y económica, requiere de una alta producción de leche y de un buen desempeño reproductivo (Marini et al., 2007). Dos de los factores que influyen en esta productividad son la edad y el peso de las novillas cuando alcanzan su madurez

reproductiva, ya que la reducción del periodo de levante y un crecimiento rápido, que las acerque en menor tiempo a la etapa reproductiva, da como resultado una vida útil más productiva y más prolongada (Villalobos et al., 2005).

El peso de la novilla, más que la edad, determina la presentación de la pubertad y del primer celo (Villalobos et al., 2005, González et al., 2007); el primer signo de éste, generalmente aparece cuando la novilla ha alcanzado el 60% de su peso adulto, sin embargo algunas novillas pueden alcanzar este estado con un menor peso, en cuyo caso debe evitarse el servicio. Por esto, el peso y el desarrollo corporal, son los criterios más válidos para decidir cuándo se realiza el primer servicio de una novilla (Villalobos et al., 2005).

Otro reto para el ganadero, además de que el animal llegue a la pubertad, es el de llevarlo al parto con un 80-85% de su peso adulto, la deficiencia de la nutrición, el bajo peso y desarrollo en este periodo, produce retrasos en el retorno de la actividad ovárica postparto, celos sin ovulaciones, celos silenciosos y mortalidad embrionaria (Villalobos et al., 2005).

Un sistema complejo como el eje somatotrópico, juega un papel clave en el control del desarrollo de los animales. Los genes que operan en este sistema son los responsables del crecimiento posnatal, principalmente la hormona de crecimiento (BGH), que actúa sobre diferentes lugares como huesos, músculos y tejidos (Sellier, 2000; Pereira et al., 2005; Echeverri et al., 2011). Esta hormona es un agente anabólico sintetizado y secretado de manera circadiana y pulsátil por las células somatotropas del lóbulo anterior de la hipófisis (Ayuk y Sheppard, 2006), siendo la principal responsable del crecimiento longitudinal, el desarrollo, la lactancia y la reproducción (Akers, 2006; Ayuk y Sheppard, 2006; McMahon, 2001; ThidarMyint et al., 2008). Se ha reportado, que algunas variaciones alélicas del gen de la BGH se asocian con características en el aumento de la canal, el peso vivo (Grochowska et al., 2001) y con el peso al nacimiento en el ganado lechero (Biswas et al., 2003).

En la industria los parámetros de crecimiento de los animales son de gran preocupación durante la cría por su determinante valor económico (Hua et al., 2009). La asociación de los polimorfismos de este gen con características de crecimiento lo hacen candidato para su utilización en programas de selección asistida por marcadores moleculares para estas características de crecimiento, y podría utilizarse como una ayuda para seleccionar animales que entren a etapas reproductivas tempranas y que además ayuden a evitar grandes pérdidas económicas que se generan en la cría ineficiente de los animales hasta la madurez (Aruna et al., 2004).

El objetivo de esta investigación fue determinar la asociación del polimorfismo del intrón 3 del gen de la BGH con características de crecimiento relacionadas con el inicio de la vida productiva en novillas Holstein del departamento de Antioquia.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Áreas y población en estudio

Se utilizaron 480 novillas de la raza Holstein pertenecientes a 8 hatos lecheros ubicados en el trópico alto Antioqueño, en las zonas del norte y el oriente del departamento, en los municipios de San Pedro de los Milagros (Altura: 2.475 m.s.n.m; T°: 14°C), Belmira (Altura: 2.550 m.s.n.m; T°: 14°C) y Medellín corregimiento Santa Elena (altura: 2500 m.s.n.m; T°: 17°C). La información fenotípica utilizada, correspondió a la capturada históricamente en cada uno de los hatos y se complementó con información obtenida mediante visitas bimensuales llevadas a cabo a los hatos durante un periodo de 24 meses.

3.4.2 Extracción de DNA y determinación de las variantes genotípicas

Para la determinación de las variantes alélicas y genotípicas se extrajo sangre de la vena coccígea y se realizó la extracción del DNA mediante la técnica de salting out descrita por Miller et al. (1988).

La pureza del ADN genómico se determinó mediante un análisis de absorbancia en dos longitudes de onda. Sólo el ADN genómico con una pureza ideal entre 1.8-2.0 se consideró para los análisis moleculares posteriores.

Los cebadores utilizados para amplificar la región específica del intrón 3 del gen de la BGH que contienen el polimorfismo, fueron los descritos por Dybus (2002) y son los siguientes: **F** 5'- CCCACGGGCAAGAATGAGGC-3' y **R** 5' TGAGGAACTGCAGGGGCCCA-3'. La amplificación se realizó con un volumen final de 25 µL, que contenían 2.5 µL buffer PCR 10X (1.0 -1.5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl, pH de 8.3), 0.2 µM de cebadores, 0.4 mM de cada dNTP, 2mM de MgCl₂, 1 unidad de taq DNA polimerasa (Bioline ®) y 30-60 ng de DNA genómico

La PCR se realizó en un termociclador (Biometra®). Las condiciones para la amplificación de la región específica del intrón 3 del gen BGH fueron primero una desnaturalización con un calentamiento inicial de cinco minutos a 94°C, una desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento de cebadores (annealing) a 55°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto, se repitió desde el paso 2 hasta el 4 durante 39 ciclos para finalizar un paso de extensión de 3 minutos a 72 °C para terminar la reacción (Dybus, 2002).

La temperatura de alineamiento utilizada se determinó siguiendo la recomendación de los distribuidores de los cebadores y mediante diferentes ensayos que arrojaron mayor eficiencia de alineamiento a la temperatura citada (55°C) (Dybus, 2002). Como control positivo de todas las reacciones se realizó la amplificación de muestras que fueron previamente evaluadas y como control negativo reacciones en ausencia de DNA.

Las variantes genotípicas fueron determinadas mediante la utilización de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), usando la enzima de restricción MspI. Para la digestión se usó un volumen final de 20 µl que contenía 5 µl del producto de PCR, 2 µl de buffer Tango 1X, 12.5 µl de agua ultra pura, los cuales fueron sometidos a digestión con 5 unidades de enzima de restricción MspI durante tres horas a 37°C, el

producto se observó por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y fue teñido con bromuro de etidio.

El patrón de restricción esperado para el genotipo (-/-) fue un fragmento de 329pb, para el genotipo (-/+) tres fragmentos (329pb, 224pb y 105pb) y para el genotipo (+/+) dos fragmentos (224pb y 105pb).

3.4.3 Estimación de las frecuencias alélicas.

La frecuencia de los diferentes alelos se estimó determinando la proporción de cada forma del gen entre el número de copias totales de la población en estudio. Se identificaron los homocigotos (dos copias del mismo alelo) y los heterocigotos (una copia de cada alelo), y se calculó la frecuencia F de cada alelo contando los homocigotos y añadiendo la mitad de los heterocigotos, con el método descrito por Hartl (2000).

Frecuencia total (p) de los alelos 1 en la población:

$$p = F_{a/a} + \frac{1}{2} F_{a/b}$$

Frecuencia total (q) de los alelos 2 en la población:

$$q = F_{b/b} + \frac{1}{2} F_{a/b}, \text{ donde;}$$

$F_{a/a}$ y $F_{b/b}$ = Homocigóticos

$F_{a/b}$ = Heterocigótico

3.4.4 Análisis estadístico

Para determinar la asociación de cada una de las características con el genotipo para el intrón 3 del gen BGH, se llevó a cabo el ajuste de modelos lineales generalizados basados en las fuentes de variación conocidas para cada una de las variables dependientes (Peso al primer servicio, peso al primer parto y ganancia diaria de peso). El análisis de medias de Tukey fue utilizado para determinar las diferencias entre las

medias para cada uno de los niveles de los efectos fijos incluidos en los modelos. Se utilizó el paquete estadístico SAS 9.2., para todos los análisis (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

El modelo general de efectos fijos llevado a cabo fue el siguiente:

$$Y_{ijklmnopq} = \mu + G_i + H_j + AN_k + MN_l + (H*G)_m + (E)n + (H*MN)_o + (H*MN*AN)_p + (H*AN)_q + e_{ijklmnopq}$$

Dónde:

$Y_{ijklmnopq}$ = Peso al primer servicio, peso al primer parto o ganancia diaria , del individuo X, portador del genotipo i, ubicado en el hato j, con año de nacimiento k y mes de nacimiento l.

μ = Media para la característica

G_i = Efecto fijo del Genotipo para BGH (i= 1...3)

H_j = Efecto fijo del hato (j = 1...8)

AN_k = Efecto fijo del Año de Nacimiento (k=1...15)

MN_l = Efecto fijo del mes de Nacimiento (l=1...12).

$(H*G)_m$ = Efecto fijo de la interacción entre el genotipo y el hato (m=1...13)

$(E)n$ = Efecto de la covariable Edad primer servicio y edad al primer parto (n=1...1)

$(H*AN)_q$ = Efecto fijo de la interacción entre el hato y el año de nacimiento (n=1...46)

$(H*MN)_o$ = Efecto fijo de la interacción entre el hato y el mes de nacimiento (o=1...68)

$(H*MN*AN)_p$ = Efecto fijo de la interacción entre el hato, el mes de nacimiento y el año de nacimiento (p=1...41)

$e_{ijklmnop}$ = Error experimental.

Los efectos de todas las interacciones solo fueron utilizados para el modelo de ganancia diaria de peso. Para los modelos de peso al primer servicio, peso al primer parto se

incluyó el efecto de la covariable de la edad al primer servicio y de la edad al primer parto respectivamente.

Se realizó un análisis de regresión lineal simple en SAS 9.2 para determinar la relación del efecto alélico y las variables en estudio, para este fin se convirtió a una escala cuantitativa el genotipo 0, 1 y 2 para (-/-), (+/-) y (+/+) respectivamente, usando el siguiente modelo:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + e_i$$

Dónde:

Y_i : Valor de la variable dependiente (Peso al primer servicio, peso al primer parto, ganancia diaria de peso) en función del número de alelos +.

β_0 : Intercepto

β_1 : Coeficiente de regresión lineal estimado del alelo de sustitución (+)

X_i : Número de alelos + en el individuo i. (0, 1, 2).

e_i : error residual.

3.5 Resultados

3.5.1 Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona de crecimiento (BGH)

Se amplificó un fragmento de 329pb a partir del ADN de 408 animales. El análisis de los fragmentos de restricción usando la enzima MspI, originó 2 patrones de restricción; 329pb, correspondiente al alelo (-) y 224 y 105pb, correspondiente al alelo (+). Las frecuencias alélicas de (+) y (-) fueron de 0.91 y 0.09 respectivamente. Las frecuencias genotípicas fueron 0.77, 0.2 y 0.03 para (+/+), (+/-) y (-/-) respectivamente.

3.5.2 Análisis descriptivo de las características de crecimiento de las novillas Holstein

El peso promedio para el primer servicio de las novillas Holstein fue de 379.38 ± 55.70 kg, para el peso al primer parto fue de 518.96 ± 66.77 kg y el promedio para la ganancia diaria de peso fue de 0.51 ± 0.16 kg/día.

La característica que presentó mayor variabilidad fue la ganancia de peso con un coeficiente de variación de 30.9%, las características peso al primer servicio y parto tuvieron una variación baja en la población de novillas Holstein. Los valores promedio para todas las características están dentro de los rangos normales reportados. En la Tabla 3.1 se resume la estadística descriptiva para todas las características.

Tabla 3.1 Media, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) para peso al primer servicio, peso al primer parto y ganancia diaria de peso de novillas Holstein del departamento de Antioquia.

Característica	N	Media	DE	CV
Peso al primer servicio (Kg)	476	379.2	55.7	14.6%
Peso al primer parto (Kg)	419	519.7	66.8	12.8%
Ganancia diaria de peso (Kg/día)	412	0.51	0.16	30.9%

3.5.3 Efecto del genotipo sobre las características de crecimiento

El genotipo tuvo un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre el peso al primer servicio, el modelo presentó un coeficiente de determinación de 0.97, es decir que el genotipo, el hato, el año de nacimiento, la edad al primer servicio y el mes de nacimiento explicaron en un 97% la variación del peso al primer servicio. El análisis de medias de Tukey mostró diferencias altamente significativas entre las medias ($P < 0.01$) de los genotipos, denotando que los animales con genotipo (-/-) pesaron 28.15 kg más que los animales

de genotipo (+/+). Los individuos con genotipo (+/-) fueron superiores en 6.77 kg de peso al primer servicio que los (+/+) los cuales presentaron menor peso. Tabla 3.2.

El genotipo tuvo un efecto altamente significativo ($P < 0.01$) sobre el peso al primer parto, el modelo presentó un coeficiente de determinación de 0.97, indicando que los efectos como el genotipo, el hato, el año de nacimiento, el mes de nacimiento y la edad al primer parto explican en un 97% la variación de esta característica. El análisis de medias de Tukey arrojó diferencias significativas ($P < 0.05$), los animales de genotipo (-/-) pesaron 73.6kg y 68.7 kg más que los animales (+/+) y (+/-) respectivamente, Tabla 2.

Para la característica ganancia diaria de peso, el genotipo no tuvo un efecto significativo ($P > 0.05$). El modelo presentó un coeficiente de determinación de 0.82, indicando que los efectos del hato, el año de nacimiento, mes de nacimiento, la interacción entre el mes y año de nacimiento, entre el hato y año de nacimiento, hato y mes de nacimiento y la interacción entre el hato el mes y el año de nacimiento explicaron en un 82% la variación de la ganancia diaria de peso. El análisis de medias de Tukey tampoco mostró diferencias significativas entre los genotipos ($P > 0.05$), Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Asociación entre los genotipos del intrón 3 del gen BGH con peso al primer servicio, peso al primer parto y ganancia diaria de peso de novillas Holstein del departamento de Antioquia.

Genotipo	Peso al primer servicio (Kg)	Peso al primer parto (Kg)	Ganancia de peso (Kg/día)
(+/+)	373.61 a	514.0 ^a	0.52 ^a
(+/-)	380.38 b	518.8 ^a	0.52 ^a
(-/-)	401.76 c	587.6b	0.55 ^a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($P < 0.05$)

3.5.4 Efecto de sustitución alélica del polimorfismo del intrón 3 del gen **BGH** sobre las características de crecimiento de novillas Holstein de Antioquia.

El coeficiente de regresión (β) para el peso al primer servicio fue de -9.24 indicando que por cada alelo (+) que aporte el individuo el peso disminuye en 9.24 kg en el primer servicio, para el peso al primer parto se encontró un β de -16.0 lo que se traduce en que por cada alelo (+) el peso al primer parto disminuye en 16.0 kg. El coeficiente de regresión estimado para la ganancia diaria de peso no tuvo significancia estadística ($P>0.05$). El β para esta característica fue de -0.008 indicando que por cada alelo (+) la ganancia diaria de peso disminuye en 0.008 kg (8 gramos). Los coeficientes de regresión de cada una de las características son mostrados en la Tabla 3.3.

Los coeficientes de regresión estimados para las características de pesos al primer servicio y al primer parto fueron altamente significativos ($P<0.01$), para la característica ganancia diaria de peso fue significativo ($P<0.05$).

Tabla 3.3 Coeficientes de regresión para las características peso al primer servicio, peso al primer parto y ganancia diaria de peso para novillas Holstein del departamento de Antioquia.

Característica	Intercepto (I)	Beta (β)	Error Estándar β
Peso al primer servicio (Kg)	391.81	-9.24	1.94
Peso al primer parto (Kg)	545.37	-16.0	4.57
Ganancia diaria de peso (Kg)	0.53	-0.008	0.031

3.6 Discusión

Las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas en el presente trabajo son similares a las reportadas por Gorbani et al. (2009), en una población de 183 animales de raza Holstein, donde se encontraron frecuencias de 0.787, 0.191 y 0.022 para los genotipos (+/+), (+/-) y (-/-) respectivamente, y para los alelos (+) y (-) que fueron de 0.883 y 0.117 respectivamente.

Pereira et al. (2005) encontraron asociación de un polimorfismo del gen BGH en el quinto exón en la posición +2141 (que es una sustitución de una citosina (C) por una guanina (G) y provoca un cambio de aminoácido leucina (L) a una valina (V) en la proteína) con el peso al año en una población cruzada Charoláis x Cebú. Los autores mencionan la superioridad del genotipo LV en comparación con LL respecto a esta característica, destacando como el alelo V aumenta el peso al año; las características peso de nacimiento y peso al destete no mostraron asociaciones.

Reis et al. (2001) encontraron que el genotipo LV se asoció positivamente con mayor peso en las etapas posteriores del crecimiento en razas productoras de carne portuguesas (desde 70% del peso vivo hasta el sacrificio), sin embargo para ambos estudios el pequeño tamaño de la muestra no permitió observar el efecto del genotipo VV. Otros estudios realizados por Chrenek (1998), reportaron que el genotipo VV se asoció con menor peso corporal y ganancia diaria de peso en toros Simmental en comparación con los genotipos LL o LV.

Son pocos los estudios sobre asociaciones del polimorfismo del intrón 3 del gen BGH con parámetros de crecimiento y aunque existen algunos reportes, éstos se han concentrado principalmente en ganado de carne, lo que convierte a este estudio pionero en correlacionar parámetros de crecimiento de ganado de leche y el polimorfismo mencionado.

Unanian et al. (2000), encontraron influencia del genotipo DD (que corresponde al genotipo $-/-$) de BGH/Msp I, sobre la ganancia diaria de peso a los 14 meses después del destete, se estudió la influencia del genotipo sobre el peso al nacimiento, peso al destete y las ganancias diarias desde el destete hasta los 12, 13 y 14 meses, características para las cuales no se encontraron diferencias significativas entre genotipos, las frecuencias alélicas obtenidas en este estudio con ganado de raza Nellore, indican que el predominio del alelo D aparece más prevalente en el Cebú mientras que el alelo C es más prevalente en el *Bos Taurus* (Lagziel et al., 2000; Unanian et al., 2000; Gorbani et al., 2009) revelando además que el alelo D, el cual es favorable y de alta frecuencia en el Cebú, para la ganancia diaria de peso desde el destete a los 14 meses,

tiene una baja frecuencia en el género *Bos Taurus* mostrando diferencias entre estas dos especies.

Los estudios de Lagziel et al. (2000), Unanian et al. (2000) y Gorbani et al. (2009) concuerdan con los resultados de este estudio, donde el alelo (-) (que es el mismo D de los autores antes mencionados) tiene una baja frecuencia en el ganado Holstein, lo cual podría explicar por qué los individuos *Bos Indicus* son animales especializados en producción de carne, ya que tienen una fuerte influencia y predominio de este genotipo, favorable para el aumento y la ganancia de peso.

Algunos reportes de otros estudios han sugerido que el genotipo del intrón 3 BGH (+/+) (o genotipo C de otros autores) de este polimorfismo, es el más favorable para producción de leche y proteína (Dybus, 2002; Zwierzchowski, 2002). Como en estas poblaciones Holstein se han trabajado apareamientos dirigidos (selección artificial) para lograr mayores volúmenes de producción de leche, esto podría explicar por qué el genotipo (-/-) que fue favorable para el aumento de peso fue de baja frecuencia en este tipo de ganado que es especializado en producir altos volúmenes de leche y no especializado en producir carne como el Cebú.

Los resultados son información relevante para la toma de decisiones en los programas de mejoramiento genético, ya que la implementación de esta en programas de selección asistida por marcadores moleculares es útil para elegir animales que entren a etapas reproductivas tempranas, para evitar pérdidas económicas que eventualmente se generan hasta que lo animales llegue a la madurez (Aruna et al., 2004).

3.7 Conclusiones

Aunque son claras las tendencias en las asociaciones del gen de la hormona del crecimiento bovino con el peso al primer servicio y al primer parto la baja frecuencia de algunos de los genotipos encontrados genera una gran dificultad para determinar el grado de asociación que tiene cada uno de éstos con las características evaluadas. Por ello se requiere, aumentar el tamaño muestral para conseguir resultados que generen

mayor confiabilidad. Sin embargo se encontró que el genotipo +/+ es el más deseado para el peso al primer servicio y peso al primer parto.

Estos resultados son el primer reporte que asocia el peso al primer servicio, peso al primer parto y ganancia diaria de peso con el polimorfismo del intrón 3 del gen de BGH en ganado Holstein de trópico alto colombiano. La asociación de estas características dentro la producción animal, son de gran utilidad como criterio de selección de individuos con genotipos favorables para su utilización en programas de mejoramiento genético

3.8 Referencias

AKERS R. Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2006; 89 (4): 1222 - 1234.

ARUNA P, CHAKRAVARTY A, BHATTACHARYA T, JOSHI B, ARJAVA S. Detection of polymorphism of growth hormone gene for the analysis of relationship between allele type and growth traits in Karan Fries cattle. *J Anim Sci.* 2004; 17 (10): 1334 - 1337.

AYUK J, SHEPPARD M. Growth hormone and its disorders. *Postgrad Med J.* 2006; 82 (963): 24 - 30.

BISWAS T, BHATTACHARYA T, NARAYAN A, BADOLA S, KUMAR P, SHARMA A. Growth hormone gene polymorphism and its effect on birth weight in cattle and buffalo. *J Anim Sci.* 2003; 16 (4): 494 - 497.

CHRENEK P, KMEF J, SAKOWSKI I, VA_ICEK D, HUBA J, CHRENEK J. Relationships of growth hormone genotypes with meat production traits of Slovak Pied bulls. *Czech J Anim Sci.* 1998; 43 (12): 541 - 544.

DYBUS A. Associations of growth (GH) and Prolactin (PRL) genes polymorphisms with milk production traits in Polish Black and White cattle. *Anim Sci P.* 2002; 20 (4): 203 - 212.

ECHEVERRI J, LOPEZ A, ARANGO J, RODRIGUEZ N, FORERO J, RINCON J. *Genética Molecular: Aplicada al mejoramiento animal.* 1 Ed. Medellín; 2011.

GONZALEZ C, MADRID N, GOCICHEA J, VILLALOBOS D, RODRIGUEZ M. Primer servicio en novillas de doble propósito. *Rev cient.* 2007; 13 (1): 39 - 46.

GORBANI A, VAEZ T, BONYADI M, AMIRINIA C. A MspI PCR-RFLP within bovin growth hormone gene and its association with sperm quality traits in Iranian Holstein bulls. *Afr J Biotechnol.* 2009; 8 (19); 4811 - 4816.

GROCHOWSKA R, LUNDEN A, ZWIERCHOWSKI L, SNOCHOWSKI M, OPRZADEK J. Association between gene polymorphism of growth hormone and carcass traits in dairy bulls. *Anim Sci.* 2001; 72: 441 - 447.

HARTL D. *A primer of populations Genetics.* En: Sinauer Associates, Inc. Publishers. 3 edition. Sunderland, Massachusetts. U.S.A. 2000. p. 26 - 31.

HUA G, CHEN S, YU J, CAI K, WUA C, LI Q, et al. Polymorphism of the growth hormone gene and its association with growth traits in Boer goat bucks. *Meat Science.* 2009; 81: 391 - 395.

LAGZIEL A, DENISE S, HANOTTE O, DHARA S, GLAZKO V, RUSSO V, et al. Geographic and breed distribution of an MspI PCR-RFLP in the bovine growth hormone (BGH) gen. *Anim genet.* 2000; 31: 210 - 213.

MARINI P, CHARMANDARIAN D, MASSO R. Desempeño productivo y reproductivo de vacas de diferentes edades al primer parto en sistemas a pastoreo. Sitio Argentino de Producción Animal. Cusco, Perú, 2007.

MILLER S, DYKES D, POLESKY H. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 1988; 16: 1215.

McMAHON C, RADCLIFF R, LOOKINQLAND K, TUCKER H. Neuroregulation of growth hormone secretion in domestic animals. *Domest Anim Endocrin.* 2001; 20 (2): 65 - 87.

PEREIRA A, MAURÍCIO M, HENRIQUE N, LUCIANA C. Association of GH and IGF1 polymorphisms with growth traits in a synthetic beef cattle breed. *Genet Mol Biol.* 2005; 28 (2): 230 - 236.

REIS C, NAVAS D, PEREIRA M, CRAVADOR A. Growth hormone AluI polymorphism analysis in eight portuguese bovine breeds. *Arch zootec.* 2001; 50: 41 - 48.

SELLIER P. Genetically caused retarded growth in animals. *Domest Anim Endocrinol.* 2000; 19: 105 - 119.

SAS 9.2 SQL Procedure User's Guide. SAS Institute., Inc., Cary, N.C, USA, 2009.

THIDARMYINT H, YOSHIDA H, ITO T, HE M, INOUE H, KUWAYAM H. Combined administration of ghrelin and GHRH synergistically stimulates GH release in Holstein preweaning calves. *Domest Anim Endocrinol.* 2008; 34 (1): 118 - 123.

UNANIAN M, BARRETO C, FREITAS A, CORDEIRO C, JOSAHKIAN L. Associação do Polimorfismo do Gene do Hormônio de Crescimento com a Caraterística Peso em Bovinos da Raça Nelore. *Rev bras Zootec.* 2000; 29 (5): 1380 - 1386.

VILLALOBOS D, ARMANDO M. Manejo de las novillas de reemplazo. Manual de Ganadería Doble Propósito. Unidad de Investigación en Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. 2005.

ZWIERZCHOWSKI L, KRZYZEWESKI J, STRZALKOWSKA N, SIADKOWSKA E, RYNIEWICZ Z. Effects of polymorphism of growth hormone (GH), Pit-1, and Leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of polish black-and-white cows. Anim Sci P. 2002; 20 (2): 213 -227.

Capítulo 4

Asociación del polimorfismo del intrón 3 de la hormona de crecimiento bovino (BGH) con características reproductivas en ganado Holstein del departamento Antioquia

Association between polymorphism of the intron 3 of bovine growth hormone gene (BGH) and reproductive characters in Holstein cattle in Antioquia state

Artículo en proceso de sometimiento en Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica-Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales

4.1 Resumen

Objetivo. Determinar la asociación del polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona de crecimiento bovino (BGH) con el número de servicios por concepción, los días abiertos y el intervalo entre partos en vacas de raza Holstein del departamento de Antioquia. **Materiales y métodos.** El estudio se realizó con 415 vacas, ubicadas en ocho hatos de tres Municipios del departamento de Antioquia. La genotipificación se llevó a cabo usando la técnica de PCR-RFLP con DNA extraído de células de sangre periférica mediante la técnica de salting out. La información fenotípica utilizada fue recopilada durante 4 años, a partir de un programa de control de producción lechera vigente en los hatos. Para la asociación se realizaron análisis estadísticos con métodos paramétricos. **Resultados.** Las frecuencias alélicas para los alelos (+) y (-) fueron 0.91 y 0.09 respectivamente. Las frecuencias genotípicas fueron 0.77, 0.2 y 0.03 para (+/+), (+/-) y (-/-) respectivamente. Se presentaron diferencias significativas entre las medias de los días abiertos, intervalo entre parto y número de servicios por concepción; para todas estas características los animales portadores del genotipo (+/+) tuvieron los parámetros menos favorables. **Conclusiones.** Los resultados indican la asociación del polimorfismo del intrón 3 de BGH con el número de servicios para la primera concepción, intervalo entre parto y los días abiertos, facilitando la selección de estos genotipos para su utilización en programas de mejoramiento genético y reproductivo.

Palabras clave: PCR-RFLP, eficiencia reproductiva, análisis molecular, marcadores moleculares.

4.2 Abstract

Objective. To determine the association of the polymorphism of intron 3 of the bovine growth hormone (BGH) with the number of services by conception, days open and interval between calving in Holstein cows from the Antioquia state. **Materials and methods.** The study was conducted with 415 cows, located in 8 herds from three municipalities from the Antioquia state. Genotyping was performed using PCR-RFLP with DNA extracted from peripheral blood cells by salting out technique. The phenotypic information used was collected for 4 years, in a control program of milk production that exist in the dairy herds. For the association analyzes were performed analysis with parametric statistical methods. **Results.** Allelic frequencies for the alleles (+) and (-) were 0.91 and 0.09 respectively. The genotypic frequencies were 0.77, 0.2 and 0.03 for (+/+), (+/-) and (-/-) respectively. There were significant differences between the means of open days, interval between calvings and number of services by conception, for all these characteristics the cows with the genotype (+/+) had the worst parameters. **Conclusions.** These results indicate the association between the polymorphism in the intron 3 of the BGH with the number of services for the first conception, interval between calvins and days open, facilitating the selection of these genotypes for the use in breeding and reproductive programs.

Keywords: PCR-RFLP, reproductive efficiency, molecular analysis, molecular markers.

4.3 Introducción

La rentabilidad de los hatos lecheros depende en gran medida del mantenimiento de una alta eficiencia reproductiva. Una reproducción adecuada permite una mayor producción de leche durante la vida del animal y el mayor beneficio de esta eficiencia se obtiene cuando la mayoría de las vacas tienen su primer parto alrededor de los 24 meses de edad, paren en intervalos de 13 a 13.5 meses y pasan la mayor proporción de su vida en la fase de lactancia (Faure y Morales, 2003).

Procesos biológicos como el crecimiento y la reproducción son eventos importantes, controlados por la interacción de varias hormonas polipeptídicas. La hipófisis es una de las glándulas más importantes del cuerpo ya que segrega las hormonas que rigen dichos procesos vitales entre ellas la hormona de crecimiento bovino (BGH) (Le et al., 2001; Echeverri et al., 2011).

La BGH es uno de los principales factores que regulan el crecimiento posnatal y desempeña un papel crítico en el desarrollo de la glándula mamaria, la lactancia y la fertilidad en el ganado (Jiang y Lucy, 2001; Renaville et al., 2002; Lucy, 2008; Mullen, 2010). En las últimas décadas el objetivo de la selección genética ha estado exclusivamente enfocado a la producción de leche, conduciendo a la disminución de la eficiencia reproductiva que empezó a declinar como resultado a las altas exigencias de volúmenes de producción (Komisarek et al., 2011; Wathes et al., 2007). Esto debido a que parece que los genes que presuntamente afectan positivamente el rendimiento productivo, también pueden alterar negativamente las características de fertilidad en el ganado.

Desde la década de 1920, está bien documentado que (BGH) influye en procesos tales como la reproducción y se cree que tiene acciones estimulantes sobre la función gonadal (Scaramuzia et al., 1999). Su concentración en sangre ha demostrado estar asociada a la edad de la pubertad, ovulaciones dobles, desarrollo embrionario y actividad ovárica postparto (Velásquez et al., 2008; Komisarek et al., 2011). También se ha reportado que existe una relación significativa entre las concentraciones circulantes de BGH y el intervalo entre partos, lo que sugiere que la BGH puede ser un criterio de selección para la fertilidad (Hayhurst et al., 2009).

Estos hallazgos sugieren que por lo menos alguna variación de los niveles de la BGH sea debido a algunas mutaciones del gen que la codifica, por tanto puede convertirse en un gen candidato para identificar marcadores genéticos para mejorar la fertilidad y la producción de leche en el ganado (Mullen et al., 2010).

El objetivo de esta investigación fue determinar la asociación del polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona de crecimiento bovino (BGH) con características reproductivas en vacas Holstein del departamento de Antioquia.

4.4 Materiales y métodos.

4.4.1 Áreas y población en estudio

Se utilizaron 415 animales de la raza Holstein pertenecientes a 8 hatos lecheros ubicados en el trópico alto Antioqueño, en las zonas del norte y el oriente del departamento en los municipios de San Pedro de los Milagros (Altura: 2.475 m.s.n.m; T°: 14°C), Belmira (Altura: 2.550 m.s.n.m; T°: 14°C) y Medellín corregimiento Santa Elena (altura: 2500 m.s.n.m; T°:17°C). La información fenotípica utilizada, fue recopilada durante 4 años, por medio de un programa de control de producción lechera existente en los hatos.

4.4.2 Extracción del ADN de células de sangre

Para la determinación de las variantes genotípicas, se extrajo de células de sangre de la vena coccígea y se realizó la extracción del DNA, mediante la técnica de salting out, descrita por Miller et al. (1988). Sólo el DNA genómico con una pureza ideal entre 1.8-2.0 se consideró para los estudios a realizar.

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos, de 20 pares de bases **F5'CCCACGGGCAAGAATGAGGC3'** y **R5'TGAGGAACTGCAGGGGCCCA3'**, que permitieron amplificar el fragmento de 329 pb que presenta el sitio de restricción para la endonucleasa MspI (Dybus, 2002).

Se realizó una amplificación por PCR para la región específica usando un volumen final de 25 µL que contenía 2.5 µL buffer PCR 10X (1.0 -1.5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl, pH de 8.3), 0.2 µM de cebadores, 0.4 mM de cada dNTP, 2mM de MgCl₂, 1 unidad de taq DNA polimerasa (Bioline ®) y 30-60 ng de DNA genómico.

La PCR se realizó en un termociclador (Biometra®). Las condiciones para la amplificación de la región específica del intrón 3 del gen BGH fueron una desnaturalización con un calentamiento inicial de cinco minutos a 94°C, seguido de 39

ciclos con una desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento de cebadores (annealing) a 55°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto; para finalizar un paso de extensión de 3 minutos a 72°C para terminar la reacción (Dybus, 2002). La temperatura de alineamiento utilizada se determinó siguiendo la recomendación de los distribuidores de los cebadores y mediante diferentes ensayos que arrojaron mayor eficiencia de alineamiento a la temperatura citada (55°C) (Dybus, 2002). Como control positivo de todas las reacciones se realizó la amplificación de muestras que fueron previamente evaluadas y como control negativo reacciones en ausencia de DNA. Las variantes genotípicas fueron determinadas mediante la utilización de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), usando la enzima de restricción MspI. Para esta digestión se usó un volumen final de 20 µl que contenía 5 µl del producto de PCR, 2 µl de buffer Tango 1X, 12.5 µl de agua ultra pura los cuales fueron sometidos a digestión con 5 unidades de enzima de restricción MspI durante tres horas a 37°C. El producto se observó por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% que fue teñido con bromuro de etidio. El patrón de restricción esperado para el genotipo (-/-) fue un fragmento de 329pb, para el genotipo (+/-) tres fragmentos (329pb, 224pb y 105pb) y para el genotipo (+/+) dos fragmentos (224pb y 105pb).

4.4.3 Estimación de las frecuencias alélicas.

La frecuencia de los diferentes alelos se estimó determinando la proporción de cada forma del gen entre el número de copias totales de la población en estudio. Se identificaron los homocigotos (dos copias del mismo alelo) y los heterocigotos (una copia de cada alelo) y se calculó la frecuencia F de cada alelo contando los homocigotos y añadiendo la mitad de los heterocigotos, con el método descrito por Hartl (2000).

Frecuencia total (p) de los alelos 1 en la población:

$$p = F_{a/a} + \frac{1}{2} F_{a/b}$$

Frecuencia total (q) de los alelos 2 en la población:

$$q = F_{b/b} + \frac{1}{2} F_{a/b}, \text{ donde;}$$

F a/a y Fb/b = Homocigóticos

F a/b = Heterocigótico

4.4.4 Análisis estadístico

Para determinar la asociación de cada una de las características con el genotipo para el intron 3 del gen BGH, se llevó a cabo el ajuste de modelos lineales generalizados basados en las fuentes de variación conocidas para cada una de las variables dependientes (Número de servicios para la primera concepción, días abiertos e intervalo entre partos). El análisis de medias de Tukey fue utilizado para determinar las diferencias entre las medias para cada uno de los niveles de los efectos fijos incluidos en los modelos. Se utilizó el paquete estadístico SAS 9.2., para todos los análisis (SAS Inst. Inc., Cary, NC, 2009).

El modelo general de efectos fijos llevado a cabo fue el siguiente:

$$Y_{ijklmnop} = \mu + G_i + H_j + AN_k + MN_l + (MN*AN)_m + (H*AN)_n + (H*MN)_o + (H*MN*AN)_p + (H+G)q + e_{ijklmnop}$$

Dónde:

$Y_{ijklmnop}$ =	Número de servicios al primer parto, días abiertos e intervalo entre partos, del individuo X, portador del genotipo i, ubicado en el hato j, con año de nacimiento k y mes de nacimiento l.
μ =	Media para la característica
G_i =	Efecto fijo del Genotipo para BGH (i= 1...3)
H_j =	Efecto fijo del hato (j = 1...8)
AN_k =	Efecto fijo del Año de Nacimiento (k=1...15)
MN_l =	Efecto fijo del mes de Nacimiento (l=1...12).
$(MN*AN)_m$ =	Efecto fijo de la interacción entre el mes de nacimiento y el año de nacimiento (m=1...86)
$(H*AN)_n$ =	Efecto fijo de la interacción entre el hato y el año de nacimiento (n=1...46)

$(H*MN)_o=$	Efecto fijo de la interacción entre el hato y el mes de nacimiento ($o=1\dots68$)
$(H*MN*AN)_p=$	Efecto fijo de la interacción entre el hato, el mes de nacimiento y el año de nacimiento ($p=1\dots41$)
$(H+G)_q=$	Efecto de la interacción genotipo y hato ($q=1\dots8$)
$e_{ijklmnopq} =$	Error experimental.

Se realizó un análisis de regresión lineal simple para determinar el efecto de sustitución alélica, con cada una de las variables en estudio, para este fin, el genotipo se convirtió a una escala cuantitativa 0, 1 y 2 para (-/-), (+/-) y (+/+) respectivamente. El modelo de regresión lineal utilizado fue el siguiente:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + e_i$$

Donde:

Y_i : Valor de la variable dependiente (Número de servicios al primer parto, días abiertos e intervalo entre partos) en función del número de alelos +.

$\beta_0 =$ Intercepto

$\beta_1 =$ Coeficiente de regresión lineal estimado del alelo de sustitución (+)

X_i : Número de alelos + en el individuo i . (0, 1, 2).

e_i : error residual.

4.5 Resultados

4.5.1 Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del intrón 3 del gen de BGH

Se amplificó un fragmento de 329pb a partir del DNA de 408 animales. El análisis de los fragmentos de restricción usando la enzima MspI, originó 2 patrones de restricción; 329pb, correspondiente al alelo (-) y 224 y 105pb, correspondiente al alelo (+). Las

frecuencias alélicas de (+) y (-) fueron de 0.91 y 0.09 respectivamente. Las frecuencias genotípicas fueron 0.77, 0.2 y 0.03 para (+/+), (+/-) y (-/-) respectivamente.

4.5.2 Análisis descriptivo

El número de servicios promedio para la primera concepción fue 1.5 ± 0.8 servicios, el promedio de los días abiertos (Tiempo que transcurre entre el parto y el instante que la hembra vuelve a quedar preñada) fue 149.2 ± 115.7 días y el promedio para el intervalo entre partos fue 430.7 ± 115.8 días. Las características de mayor variabilidad fueron el número de servicios para la primera concepción y los días abiertos con un coeficiente de variación de 55.1% y 77.57% respectivamente y el intervalo entre partos fue una característica de variación media con 26.8%. Los valores promedios de estas características están un poco por encima de las metas reproductivas para los sistemas de producción. En la Tabla 4.1 se resume la estadística descriptiva para todas las características

Tabla 4.1 Media, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) para el número de servicios para la primera concepción, días abiertos e intervalo entre partos en vacas Holstein del departamento de Antioquia.

Característica	n	Media	D E	CV
Número de servicios	353	1.5	0.8	55.1%
Días abiertos	353	149.2	115.7	77.5%
Intervalo entre partos (días)	353	430.7	115.8	26.8%

4.5.3 Efecto del genotipo sobre las características reproductivas

El genotipo mostró una diferencia altamente significativa con el número de servicios para la primera concepción ($P < 0.01$), el coeficiente de determinación para el modelo fue de 0.85, indicando que los efectos como el genotipo, el hato, el año de nacimiento, mes de nacimiento, la interacción entre el mes y año de nacimiento, entre el hato y año de

nacimiento, hato y mes de nacimiento y la interacción entre el hato el mes y el año de nacimiento, explican en un 85% la variación para esta característica. El análisis de medias de Tukey mostró que el genotipo (-/-) fue el menos favorable para la característica, ya que los animales portadores, presentaron mayor número de servicios, entre los genotipos (+/+) y (+/-) no hubo diferencias significativas ($P>0.05$) Tabla 4.2.

El genotipo tuvo un efecto significativo sobre los días abiertos, el coeficiente de determinación fue de 0.67, lo que indica que la variación para esta característica está explicada en un 67% por los efectos incluidos en el modelo. La prueba de medias de Tukey mostró que el genotipo (+/+) es el menos favorable para esta característica, ya que los individuos tuvieron mayor número de días abiertos; 17 días más que los individuos (-/-) y 16 días más que los individuos (+/-), entre los genotipos (-/-) y (+/-) no hubo diferencias significativas ($P>0.05$) Tabla 4.2.

El efecto del genotipo fue altamente significativo sobre el intervalo entre partos ($P<0.01$), el coeficiente de determinación del modelo fue de 0.67 indicando que todos los efecto que se incluyeron en este (genotipo, el hato, el año de nacimiento, mes de nacimiento, la interacción entre el mes y año de nacimiento, entre el hato y año de nacimiento, hato y mes de nacimiento y la interacción entre el hato el mes y el año de nacimiento) explican en un 67% la variación de esta característica. El análisis de prueba de medias de Tukey mostró como el genotipo (+/+) es el menos favorable, ya que los individuos tuvieron mayor intervalo entre partos; 17 días más que los individuos (-/-), entre los genotipos (-/-) y (+/-) no hubo diferencias significativas ($P>0.05$) Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Análisis de medias de Tukey para el efecto del genotipo sobre número de servicios para el primer parto, días abiertos e intervalo entre partos en vacas Holstein del departamento de Antioquia.

Genotipo	Número de servicios	Días abiertos	Intervalo entre partos
(+/+)	1.5 a	153.5 a	434.9 a
(+/-)	1.5 a	137.1b	418.1b
(-/-)	2.0 b	135.8b	417.1b

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($P < 0.05$)

4.5.4 Efecto de sustitución alélica del polimorfismo del gen BGH sobre las características reproductivas en vacas Holstein del departamento de Antioquia

Se encontró un coeficiente de regresión para los días abiertos, (β) de 13.2, es decir que por a cada alelo (+) que aporte el individuo los días abiertos aumentan 13.2 días; para el intervalo entre partos se encontró un coeficiente de regresión (β) de 13.5, es decir por cada alelo (+) en el individuo este parámetro aumenta en 13 días. El número de servicios para la primera concepción tuvo un coeficiente de regresión (β) de -0.08, indicando que por cada alelo (+) el número de servicios disminuye en 0.08.

El coeficiente de regresión estimado para el intervalo entre partos, fue altamente significativo ($P < 0.01$), los coeficiente de regresión para el número de servicio para el primer parto y los días abiertos fueron también estadísticamente significativos ($P < 0.05$). Los coeficientes de regresión de cada una de las características son mostrados en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3 Coeficientes de regresión (β), para las características número de servicios, días abiertos e intervalo entre partos en vacas Holstein del departamento de Antioquia.

Característica	Intercepto (I)	Beta (β)	Error Estándar β
Número de servicios para la primera concepción	1.7	-0.08	0.03
Días abiertos	126.7	13.2	4.6
Intervalo entre partos (días)	407.5	13.5	4.6

4.6 Discusión

Las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas en el presente trabajo son similares a las reportadas por Gorbani et al. (2009), en una población de 183 animales de raza

Holstein, donde se encontraron frecuencias de 0.787, 0.191 y 0.022 para los genotipos (+/+), (+/-) y (-/-) respectivamente, y 0.883 y 0.117 para los alelos (+) y (-) respectivamente.

La mayoría de las asociaciones de características relacionadas con la fertilidad en el ganado con el gen de la BGH se han realizado en el polimorfismo ubicado en el quinto exón en la posición 2141, en el cual una sustitución de una citosina (C) por una guanina (G) provoca un cambio de aminoácido de una leucina (L) a una valina (V) (Pereira et al., 2005; Reis et al., 2001).

Gretel et al. (2011) no encontraron ningún efecto de este genotipo con parámetros reproductivos como servicios por concepción, parto primer servicio y tasa de preñez, de igual manera Balogh et al. (2009) no encontraron ningún efecto en el tiempo de la primera ovulación posparto. Otros reportes como los de Lechniak et al. (2002) no mostraron efecto del genotipo en el número de ovulaciones, y Katalin et al. (2006) no encontraron ningún efecto con el intervalo entre partos. Komisarek et al. (2011) encontraron que el genotipo se asoció significativamente con el intervalo entre partos.

Mullen et al. (2010) incluyeron en sus estudios seis nuevos polimorfismos situados en el primer exón (región 5') y encontraron que tres de ellos (BGH32, BGH35 y BGH38, todos caracterizados por una sustitución alélica de una Timina por una Citosina en el primer exón), se asociaron con la tasa de preñez al primer servicio. También se realizaron asociaciones con el intervalo entre partos donde se encontró un efecto de los polimorfismos BGH32 y BGH38 en el tercer parto.

No se encontraron reportes para el polimorfismo del intrón 3 del gen BGH, que es el utilizado en este estudio, lo que hace que estos resultados sean pioneros en asociar este polimorfismo con los caracteres reproductivos del estudio. La baja frecuencia de algunos genotipos limita las asociaciones del polimorfismo con estos parámetros reproductivos. Aunque se encontró una asociación significativa con el número de servicios para la primera gestación, intervalo entre partos y días abiertos, denotando al genotipo (-/-) como el más favorable para estas características reproductivas.

Algunos estudios sugieren que el genotipo del intrón 3 de la BGH (+/+) para este polimorfismo está asociado favorablemente con producción y composición láctea, (Dybus, 2002; Zwierzchowski, 2002); este genotipo en el presente estudio también se asoció con mayores intervalos entre partos, días abiertos para la primera gestación y como en estas poblaciones se han trabajado apareamientos dirigidos para lograr mayores volúmenes de producción de leche, dichos apareamientos podrían explicar la baja fertilidad y la disminución de la eficiencia reproductiva que coincide con el incremento en la producción de leche en muchos hatos lecheros (Komisarek et al., 2011; Reist et al., 2003; Wathes et al., 2007).

Este hallazgo sugiere una fuente de información importante en la toma de decisiones en los programas de mejoramiento genético, ya que el aporte de esta investigación es útil para elegir animales reproductivamente más eficientes que consecuentemente tendrán una mayor producción de leche durante su vida.

4.7 Conclusiones.

Este es el primer reporte que evalúa la asociación entre el número de servicios, días abiertos para la primera gestación e intervalo entre partos con el polimorfismo del intrón 3 del gen de BGH en ganado Holstein de trópico alto colombiano, los cuales servirán de base para futuras investigaciones.

Aunque la baja frecuencia del genotipo (-/-) puede generar dificultades al momento de haber realizado estas asociaciones, se encontró que las características se asociaron favorablemente con el polimorfismo en estudio; por ende se recomienda aumentar el tamaño muestral y así generar resultados de mayor confiabilidad para facilitar la selección de estos individuos favorables para su utilización en un programa genético y reproductivo.

4.8 Referencias

BALOGH O, KOVA'CS K, KULCSA'R M, GA'SPA'RDY A, ZSOLNAI A, KA'TAI L, et al. AluI polymorphism of the bovine growth hormone (GH) gene, resumption of

ovarian cyclicity, milk production and loss of body condition at the onset of lactation in dairy cows. *Theriogenology*. 2009; 71 (4): 553 - 559.

DYBUS A. Associations of growth (GH) and Prolactin (PRL) genes polymorphisms with milk production traits in Polish Black and White cattle. *Anim Sci P*. 2002; 20 (4): 203 - 212.

ECHEVERRI J, LOPEZ A, ARANGO J, RODRIGUEZ N, FORERO J, RINCON J. *Genética Molecular: Aplicada al mejoramiento animal*. 1 Ed. Medellín; 2011.

FAURE R, MORALES C. La pubertad de la hembra bovina: I. aspectos fisiológicos. *Rev Salud Anim*. 2003; 25 (1): 13 - 19.

GORBANI A, VAEZ T, BONYADI M, AMIRINIA C. A *MspI* PCR-RFLP within bovin growth hormone gene and its association with sperm quality traits in Iranian Holstein bulls. *Afr J Biotechnol*. 2009; 8 (19): 4811 - 4816.

GRETEL R, CARRIQUIRY M, RAMOS J, PEREIRA L, MEIKLE A. Metabolic and endocrine profiles and reproductive parameters in dairy cows under grazing conditions: effect of polymorphisms in somatotropic axis genes. *Acta Vet Scand*. 2011; 53 (35) .

HARTL D. *A primer of populations Genetics*. En: Sinauer Associates, Inc. Publishers. 3 edition. Sunderland, Massachusetts. U.S.A. 2000. p. 26 - 31.

HAYHURST C, FLINT A, LOVENDAHL P, WOOLLIAMS J. Genetic variation of metabolite and hormone concentration in UK Holstein-Friesian calves and the genetic relationship with economically important traits. *J Dairy Sci*. 2009; 92 (8): 4001 - 4007.

JIANG H, LUCY M. Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation, expression and effects on translational efficiency. *Genes*. 2001; 265 (1-2): 45 - 53.

KATALIN K, JÓZSEF V, ATTILA Z, ISTVÁN G, LÁSZLÓ F. Associations between the *AluI* polymorphism of growth hormone gene and production and reproduction traits

in a Hungarian Holstein-Friesian bull dam population. *Arch Tierz.* 2006; 49 (3): 236 - 249.

KOMISAREK J, ARKADIUSZ M, ANNA W. The effects of polymorphisms in DGAT1, GH and GHR genes on reproduction and production traits in Jersey cows. *Animal Science Papers and Reports.* 2011; 29 (1): 29 - 36

LE D, BONDY C, YAKAR S, LIU J, BUTLER A. The Somatomedin Hypothesis: 2001. *Endocr Rev.* 2001; 22 (1): 53 -74.

LECHNIAK D, ADAMOWICZ T, STANISLAWSKI D, KACZMAREK D. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes in relation to GH gene polymorphism (Leu/Val). *Reprod Nutr Dev.* 2002; 42 (3): 275 - 280.

LUCY M. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reprod Domest Anim.* 2008; 43 (2): 31 - 39.

MILLER S, DYKES D, POLESKY H. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 1988; 16: 1215.

MULLEN M, BERRY D, HOWARD D, DISKIN M, LYNCH C , BERKOWICZ E, et al. Associations between novel single nucleotide polymorphisms in the *Bos taurus* growth hormone gene and performance traits in Holstein-Frisian dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2010; 93 (12): 5959 - 5969.

PEREIRA A, MAURÍCIO M, HENRIQUE N, LUCIANA C. Association of GH and IGF1 polymorphisms with growth traits in a synthetic beef cattle breed. *Genet Mol Biol.* 2005; 28 (2): 230 - 236.

RENAVILLE R, HAMMADI M, PORTETELLE D. Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domest Anim Endocrinol.* 2002; 23 (1-2): 351- 360.

REIS C, NAVAS D, PEREIRA M, CRAVADOR A. Growth hormone AluI polymorphism analysis in eight portuguese bovine breeds. Arch zootec. 2001; 50: 41-48.

REIST M, ERDIN D, VON E, TSCHÜMPERLIN K, LEUENBERGER H, HAMMON H, et al. Postpartum reproductive function: association with energy, metabolic and endocrine status in high yielding dairy cows. Theriogenology. 2003; 59 (8): 1707 - 1723

SAS 9.2 SQL Procedure User's Guide. SAS Institute., Inc., Cary, N.C, USA, 2009.

SCARAMUZZI R, MURRAYA J, DOWNINGB J, CAMPBELL C B. The effects of exogenous growth hormone on follicular steroid secretion and ovulation rate in sheep. Domest Anim Endocrinol. 1999; 17 (2-3): 269 – 277

VELASQUEZ M, SPICER L, WATHES D. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. Domest Anim Endocrinol. 2008; 35 (4): 325 - 342.

WATHES D, FENWICK M, CHENG Z, BOURNE N, LLEWELLYN S, MORRIS D, et al. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. Theriogenology. 2007; 68 (1): S232 - 41.

ZWIERZCHOWSKI L, KRZYZEWSKI J, STRZALKOWSKA N, SIADKOWSKA E, RYNIOWICZ Z. Effects of polymorphism of growth hormone (GH), Pit-1, and Leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of polish black-and-white cows. Anim Sci P. 2002; 20: 213 - 227

5 Conclusiones y recomendaciones

Conclusions and recommendations

- El polimorfismo del intrón 3 del gen de la hormona de crecimiento bovino, se encontró asociado con las edades al primer servicio, primer parto, primer servicio postparto y segundo parto, y también con características de crecimiento como el peso al primer servicio y al primer parto.
- Se encontró una asociación positiva entre el alelo (+) con la disminución de la edad al primer servicio, primer parto, primer servicio postparto y segundo parto, lo que facilita el desarrollo de la selección asistida por marcadores con estas características, para su utilización en programas de mejoramiento genético.
- Se encontró una asociación positiva entre el alelo (+) con la disminución de peso al primer servicio y al primer parto y con mayor número de servicios para la primera gestación, intervalo entre parto y días abiertos.
- No se evidenció una asociación con el polimorfismo del intrón 3 del gen de la BGH con las ganancias diarias de peso entre el primer servicio y el primer parto.
- Estos resultados son el primer reporte de asociación de estas características de crecimiento y reproductivas con el polimorfismo del intrón 3 del gen de la BGH en ganado Holstein de trópico alto colombiano. Por ello se requieren más estudios en lo que el tamaño muestral aumente para generar más confiabilidad en los resultados y en estos marcadores genéticos para poder ser utilizados en los programas de mejoramiento.

Agradecimientos

- A mi tutores, los profesores Julián Echeverri Zuluaga y Albeiro López Herrera por su valiosa asesoría y aportes en todo mi proceso de formación.
- Al Magister Jorge Eduardo Forero por su asesoría profesional, ayuda y paciencia en el trabajo de laboratorio y procedimientos moleculares.
- A los propietarios de las fincas en cada municipio por permitir en ellas este estudio.
- Al Laboratorio de Biología Molecular y celular de la Universidad Nacional Sede Medellín.
- A todos mis compañeros y colegas por su colaboración y apoyo en el desarrollo de esta investigación.