



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“Comparación de alelos de receptores para FSH y LH identificados mediante el ensayo PCR-RFLP en bovinos Holstein y Criollo de la provincia del Azuay”.

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista

Autor:

Xavier Alejandro Cuzco Paidá

CI: 0106838337

Correo electrónico (personal): alejandrocuzco196@gmail.com

Director:

Dr. Antonio Javier Vallecillo Maza

CI: 0151059417

Cuenca - Ecuador

14-abril-2021



RESUMEN:

La variabilidad en genes reproductivos, como aquellos que codifican los receptores para las hormonas folículo estimulante (FSHR) y luteinizante (LHR) ha disminuido en las últimas décadas, tanto en ganado lechero especializado como en el ganado Criollo. Curiosamente en esta última raza se sugiere una alta variabilidad importante para el mejoramiento genético y su conservación. El objetivo de estudio fue contrastar la frecuencia de los genes FSHR y LHR en las poblaciones bovinas Holstein y Criolla de la provincia del Azuay mediante un ensayo basado en la reacción en cadena de polimerasa y la identificación de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (PCR-RFLP) a partir de ADN de ambas razas. Se identificó la presencia de tres genotipos: CC; CG y GG para FSHR, y uno solo (GG) para LHR, siendo la totalidad de la población homocigota para este locus. Para FSHR, el 56% de los individuos fueron homocigotos CC, con mayor porcentaje de éstos en el ganado Holstein (67%); mientras que, en el ganado Criollo, el 55% fueron heterocigotos, siendo el alelo C predominante en ambas razas. Se observó una heterocigosis mayor para el locus FSHR, en el ganado Criollo con heterocigosis observada (H_o) (0,5517) superior a la esperada (H_e) (0,3995); mientras que el ganado Holstein presentó una heterocigosis moderada; además, en ambas razas no se evidenció presencia de consanguinidad. Tanto la diferenciación genética como las distancias entre estas dos razas fueron pequeñas. El total de la población se encontró en equilibrio genético para FSHR, estos resultados permitieron caracterizar a la población de estudio como no endogámica, con iguales frecuencias alélicas y con mayor variabilidad en la raza Criolla para este locus.

Palabras claves: Frecuencias alélicas y genotípicas. Heterocigosis. Consanguinidad. Diferenciación genética.



ABSTRACT:

Variability in reproductive genes, such as those that encode receptors for follicle-stimulating (FSHR) and luteinizing (LHR) hormones, has decreased in recent decades, both in specialized dairy cattle and in creole cattle. Curiously, in this last breed a high variability is suggested, important for genetic improvement and its conservation. The objective of the study was to contrast the frequency of the FSHR and LHR genes in the Holstein and Creole bovine populations of the Azuay province by means of an assay based on the polymerase chain reaction and the identification of restriction fragments of polymorphic length (PCR- RFLP) from DNA of both races. Three genotypes were identified: CC; CG and GG for FSHR, and only one (GG) for LHR, the entire population being homozygous for this locus. For FSHR, 56% of the individuals were CC homozygous, with a higher percentage of these in Holstein cattle (67%); while, in the Criollo cattle, 55% were heterozygous, being the C allele predominant in both breeds. Greater heterozygosity was observed for the FSHR locus, in Criollo cattle with observed heterozygosity (H_o) (0.5517) higher than expected (H_e) (0.3995); while Holstein cattle presented moderate heterozygosity; Furthermore, in both breeds there was no evidence of consanguinity. Both the genetic differentiation and the distances between these two races were small. The total population was found in genetic equilibrium for FSHR, these results allowed characterizing the study population as non-inbred, with the same allelic frequencies and with greater variability in the Creole race for this locus.

Keywords: Allelic and genotypic frequencies. Heterozygosity. Consanguinity. Genetic differentiation.



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN:	2
ABSTRACT:	3
ÍNDICE DE CONTENIDO	4
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE ANEXOS	8
AGRADECIMIENTOS	11
DEDICATORIA	12
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	13
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	14
OBJETIVOS	16
Objetivo general	16
Objetivos Específicos	16
HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN.	16
CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LITERATURA	17
2.1 Variabilidad en genes reproductivos y su implicancia en la reproducción de los bovinos de raza Holstein y Criolla	17
2.1.1 Caracterización de genes ligados a los receptores de FSH y LH, en ganado bovino Holstein y otras razas especializadas.	18
2.1.2 Caracterización de genes ligados a FSHR y LHR en ganado bovino criollo.	19
2.2 PARÁMETROS GENÉTICOS POBLACIONALES	21
2.2.1 Número de alelos por locus (Na)	21
2.2.2 Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He)	21
2.2.3 Frecuencias alélicas y genotípicas	21
2.2.4 Equilibrio de Hardy-Weinberg	21
2.2.5 Estadísticos F de Wright	22
2.2.6 Alelos nulos	23
2.3 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA MOLECULAR	23
2.4 MARCADORES GENÉTICOS BASADOS EN POLIMORFISMOS	23
2.5 TIPOS DE MARCADORES DE ADN HABITUALES	24
2.5.1 Marcadores basados en polimorfismos con repeticiones en tándem (VNRT) ...	24



2.5.2	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP).....	24
2.5.3	Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).....	24
2.6	IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS	25
2.6.1	PCR-RFLP.....	25
2.6.2	PCR	25
2.6.3	Digestión y fraccionamiento del ADN.....	26
2.6.4	Electroforesis.....	26
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS		27
3.1	Área de estudio	27
3.2	Amplificación y visualización de los productos de PCR específicos (FSHR, LHR) ..	27
3.2.1	Biológicos	27
3.2.2	Reactivos y Soluciones	27
3.2.3	Equipos y otros materiales	28
3.2.4	Método	29
3.3	Materiales a usarse en los ensayos RFLP de los productos de PCR específicos (FSHR y LHR) y la visualización de los mismos.....	31
3.3.1	Biológicos	31
3.3.2	Reactivos y soluciones.....	31
3.3.3	Equipos y otros materiales	31
3.3.4	Método	32
3.4	Diseño experimental y análisis estadístico	32
CAPÍTULO IV: RESULTADOS		33
4.1	Ensayo PCR-RFLP	33
4.2	Parámetros genéticos	37
4.2.1	Frecuencias alélicas y genotípicas.....	37
4.2.2	Heterocigosidad observada y esperada.	37
4.2.3	Equilibrio de Hardy-Weinberg	38
4.2.4	Estadísticos F de Wright.....	38
4.2.5	Distancias genéticas	39
4.2.6	Alelos nulos.....	39
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN		40
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES		44
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES		45



CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
CAPÍTULO IX: ANEXOS	51



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los marcadores de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) analizados. F(forward)= dirección 5´-3´; R(reverse)=dirección 3´-5´. LHR=receptor de la hormona luteinizante; FSHR=receptor de la hormona folículo estimulante.	27
Tabla 2. Mezcla de reacción PCR para LHR y FSHR. 40 muestras.	29
Tabla 3. Fragmentos RFLP y genotipos esperados para FSHR y LHR.	34
Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas de los genes FSHR y LHR en ganado Holstein y Criollo.	37
Tabla 5. Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) en el gen FSHR. Ho = Heterocigosidad observada;H.n.b = Heterocigosidad sin sesgo; He = Heterocigosidad esperada.	37
Tabla 6. Estadístico FIS FSHR. IC: Intervalo de confianza. W&C: Weir & Cockerham. R&H: Robertson & Hill.....	38
Tabla 7. Estadísticos F de Wright para el locus FSHR en ganado Holstein y Criollo.	39



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fragmentos amplificados del gen FSHR. Carril (M): marcador de peso molecular 100 bp (Thermo scientific Cat. No: SM0321). Carriles (1-30): producto de amplificación de 30 animales Criollos. Artificios (*).	33
Figura 2. Fragmentos amplificados de 303 bp del gen LHR. Carril (M): marcador de peso molecular 100 bp (Thermo scientific Cat. No: SM0321). Carriles (1-30): producto de amplificación de 30 animales Holstein. Artificios (*).	34
Figura 3. Productos de la digestión del gen FSHR mediante PCR-RFLP - HOLSTEIN. Genotipos: CC, GG y CG. M: marcador de peso molecular 100 bp (Thermo scientific Cat. No: SM0321). Artificios (*).	35
Figura 4. Productos de la digestión del gen FSHR mediante PCR-RFLP-CRIOLLOS. Genotipos CC y GG. ND1: producto no digerido. M: marcador de peso molecular 100 bp (Thermo scientific Cat. No: SM0321). Artificios (*).	36
Figura 5. Productos de la digestión del gen LHR mediante PCR-RFLP-CRIOLLOS. Genotipo CC. M: marcador de peso molecular 100 bp (Thermo scientific Cat. No: SM0321). ND: muestra no digerida. Artificios (*)	36

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Conteo de genotipos FSHR - LHR - HOLSTEIN.	51
Anexo 2. Conteo de genotipos FSHR - LHR - CRIOLLO.	52



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo Xavier Alejandro Cuzco Paida, autor del trabajo de titulación "Comparación de alelos de receptores para FSH y LH identificados mediante el ensayo PCR-RFLP en bovinos Holstein y Criollo de la provincia del Azuay", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 14 de Abril de 2021.

Xavier Alejandro Cuzco Paida

C.I: 0106838337



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo Xavier Alejandro Cuzco Paida en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Comparación de alelos de receptores para FSH y LH identificados mediante el ensayo PCR-RFLP en bovinos Holstein y Criollo de la provincia del Azuay", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 14 de Abril del 2021.

Xavier Alejandro Cuzco Paida

C.I: 0106838337



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco profundamente a mi madre por toda su fuerza entregada en sus madrugadas, sus cuidados, su trabajo diario, su apoyo incondicional y las enseñanzas impartidas a lo largo de todo este camino juntos y a mi padre por ser ese motor que ha mantenido y permitido cumplir con los sueños de superación de sus hijos.

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos especialmente a los doctores Guillermo Guevara y Antonio Vallecillo, por brindarme la oportunidad de acudir a sus capacidades y conocimientos y compartir conmigo los mismos, pues su apoyo y guía fue fundamental para la culminación de este trabajo. De la misma manera agradezco a los miembros de mi tribunal, la Dra. Silvana Méndez y el Ing. Raúl Guevara por su amable trato y eficaz asesoramiento en la realización de la presente tesis.



DEDICATORIA

Dedicado a mi familia por caminar pacientemente conmigo a lo largo de estos años y a mis amigos: Jessi, Xavier, Brian, Diana y Jenny, por todos los buenos y malos momentos universitarios compartidos juntos.

Xavier Alejandro Cuzco.

**ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA**

Abreviatura o símbolo:	Significado:
FSHR	Receptor de la hormona foliculo estimulante
LHR	Receptor de la hormona luteinizante
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
rpm/min	Revoluciones por minuto
h	Hora
min	Minuto
s	Segundo
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
ml	Mililitro
µl	Microlitro
mM	Milimolar
g	Gramo
µg	Microgramo
mg	Miligramo
ng	Nanogramo
v/v	Volumen sobre volumen
TAE	Tris-acetato-EDTA
Tris	Hidroximetil-aminometano
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
bp	Pares de bases
Ho	Heterocigosidad observada
He	Heterocigosidad esperada
Na/locus	Número de alelos por locus
SSR	Secuencias simples repetidas
RFLP	Fragments de restricción de longitud polimórfica
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatos
SDS	Dodecilsulfato sódico



CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

La selección genética enfocada al mejoramiento productivo del ganado lechero Holstein y llevada a cabo durante las últimas cinco décadas, ha resultado en disminución de la variabilidad y heterocigosidad de genes asociados con la fertilidad, reduciéndose esta última, así como la heredabilidad de los caracteres reproductivos en estos animales (1). De esta manera, en distintos genes como aquellos responsables de codificar los receptores tanto para FSH (FSHR) como LH (LHR), directamente relacionados con fertilidad y reproducción, se han observado diversos panoramas con respecto a sus parámetros genéticos poblacionales y/o el efecto de sus polimorfismos sobre rasgos reproductivos, tanto en poblaciones bovinas especializadas como en el ganado criollo, que confirman o no esta problemática.

Es así que, en el ganado Holstein se reportó hatos con un 48,5% de heterocigosidad y 51,7% de homocigosidad para un determinado polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) (A-320T) del gen FSHR, asumiéndose en el primer caso, a los individuos heterocigotos con una menor eficiencia reproductiva, con mayores servicios por preñez e intervalos entre partos (2, 3). Mientras que, en Holstein turcas se calculó frecuencias de homocigotos superiores al 50%, para ambos genes (4). Por otro lado, se ha observado que el resultado de cruzamientos realizados en una población bovina de carne brasileña para eliminar sus características cebuínas y alcanzar una genética europea, se representó en un 51% de los individuos siendo homocigotos para el gen FSHR (5). Por el contrario, en un diferente hato brasileño híbrido se evidenció que las contribuciones de diferentes razas que lo compusieron, generó una gran diversidad en esta población, con 58% y 54% de individuos heterocigotos para FSHR y LHR, respectivamente (6).

En el ganado criollo por su parte, a pesar de estar expuesto a cruces indiscriminados, absorción y reemplazo por parte de un grupo de razas productivamente superiores, que reducen su población afectando su integridad genética, se estima que presentan niveles óptimos o inclusive altos de variabilidad y heterocigosidad. En razas autóctonas indonesias y sudanesas, se han obtenido valores de heterocigosidad del 51% y 47,50 % para LHR, respectivamente, sin embargo, para estas últimas, el total de su población fueron homocigotas para FSHR, esto como resultado de los factores sistemáticos antes mencionados, traduciendo su efecto en pubertades tardías y periodos postparto aumentados (7, 8).



En nuestro país, se ha evidenciado una alta diversidad genética en la raza criolla. El ganado criollo Macabeo, por ejemplo, presenta valores de heterocigosidad mayores al 70% y un promedio de 7,5 alelos para cada loci estudiado y con respecto a razas comerciales como Hereford, Cebú y otras europeas (9). En los bovinos criollos lojanos se ha obtenido una heterocigosidad del 74% y 8,14 alelos para 28 microsatélites determinados (10), reportándose además valores parecidos en poblaciones criollas de Manabí (11), lo que determina en variedad genética idónea, susceptible para su conservación.

De esta manera, se observa que las diferentes variabilidades y polimorfismos en los genes FSHR y LHR, varían entre poblaciones, siendo múltiples los factores causales. Por lo descrito anteriormente, considerando que de los rasgos reproductivos depende el crecimiento y mantenimiento de una población, sumado a que en la provincia del Azuay el 73,2% de su ganado es de la raza Holstein y tan solo el 1,3% la conforma los animales criollos (12), junto con la nula disponibilidad de estudios de esta índole, es importante conocer mediante el uso de técnicas moleculares como la identificación de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), los polimorfismos, características genotípicas y el estado de equilibrio con respecto a estos dos genes, directamente vinculados con funcionalidad ovárica, tanto en poblaciones bovinas altamente productivas, cuyos caracteres reproductivos se ven afectados, así como también en el ganado criollo, por la posible alta variabilidad genética que estos poseen, la misma que se encuentra en riesgo por la disminución poblacional, absorción y cruces indiscriminados que esta población ha sufrido.

La presente investigación fue de utilidad pues nos permitió conocer la alta heterocigosis de FSHR en ambas razas analizadas, sobre todo en la raza Criolla, la cual podría ser beneficiosa y justificaría la conservación de la misma, y la fijación en las dos poblaciones del alelo identificado para LHR.

Por tal motivo, esta investigación generó datos sobre la variabilidad y estructura genética en estas poblaciones, necesarios para desarrollo de futuras investigaciones, así como de estrategias en el campo del mejoramiento genético y de conservación de especies autóctonas como fuente de biodiversidad.



OBJETIVOS

Objetivo general

Contrastar la frecuencia de alelos de los receptores de FSH y LH identificados mediante el ensayo de PCR-RFLP, en bovinos Holstein y Criollos.

Objetivos Específicos

Identificar los alelos de los locus FSH y LH mediante un ensayo PCR-RFLP.

Comparar las frecuencias génicas y genotípicas de los genes FSHR y LHR, entre ambas razas.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Existe diferencia en la frecuencia de los alelos y parámetros genéticos de los genes que codifican para los receptores de FSH (FSHR) y LH (LHR) entre las razas bovinas Holstein y Criolla?



CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Variabilidad en genes reproductivos y su implicancia en la reproducción de los bovinos de raza Holstein y Criolla

En las últimas décadas, se ha evidenciado una correlación genética negativa entre la fertilidad y los rasgos productivos, pues mientras más ha aumentado la ganancia genética para la producción de leche, el desempeño reproductivo ha disminuido. Uno de los factores responsables de este antagonismo, son las características genéticas de los animales, tanto por la presencia de polimorfismos en los genes relacionados con fertilidad, como por la pérdida de la variabilidad de los mismos (13), la primera afirmación se basa en que estos genes en diferentes poblaciones bovinas presentan variaciones en su secuencia de ADN (polimorfismos), que los pueden dotar de efectos positivos o negativos a los rasgos que estos codifican (14).

La segunda hace referencia a que existe una pérdida de la variabilidad y diversidad de estos genes, en gran parte debida a la selección intensiva para rasgos productivos, así como también a migraciones, absorción de especies, hibridación, endogamia, etc. Esta pérdida ha sido más acentuada y con efectos mayoritariamente adversos en razas bovinas altamente productivas, como la raza Holstein, en la cual este tipo de selección afectó genes asociados con la fertilidad de machos y hembras, responsables de parámetros como: desarrollo testicular; espermatogénesis; movilidad espermática; desarrollo folicular, de ovocitos y embriones; implantación y supervivencia embrionaria; desarrollo de placenta; receptividad uterina; aborto espontáneo; tasas de gestación; unión espermatozoide óvulo, etc., demostrándose que se redujo y hasta se eliminó la variabilidad de estos genes, traduciéndose en una disminución de la fertilidad y baja heredabilidad de caracteres, como la tasa de concepción o tasa de preñez (1, 15).

Por otro lado, se cree que las razas bovinas criollas, presentan un mayor polimorfismo, heterocigosidad y distintas frecuencias alélicas y genotípicas en los genes específicos de fertilidad, que se asocian positivamente a los parámetros reproductivos que codifican, esto a pesar de haber sufrido una disminución drástica de su población, debido a la absorción y/o reemplazo por parte de razas especializadas, que igualmente les coloca en una situación de vulnerabilidad, de extinción o propensos a sufrir los efectos de la consanguinidad y degradación de la pureza (5, 7).



Estas diferencias entre especies bovinas pueden ser documentadas mediante su estudio a nivel molecular, a partir del empleo de herramientas genómicas como los marcadores moleculares que permiten distinguir individuos por las variaciones en la secuencia de nucleótidos de un determinado gen. Una de las aplicaciones de los mismos se ha realizado en la investigación de los efectos que los polimorfismos de genes de fertilidad como FSHR y LHR ejercen sobre los rasgos reproductivos (16).

No obstante, en estas razas reconocidas empíricamente por estas características, se han sometido de forma limitada al análisis de estos genes candidatos, que permitiría darles un valor de importancia a las mismas (8).

2.1.1 Caracterización de genes ligados a los receptores de FSH y LH, en ganado bovino Holstein y otras razas especializadas.

La caracterización de estos dos genes en estas razas, se ha realizado no solamente para conocer su estructura y diversidad poblacional (polimorfismos, frecuencias alélicas y genotípicas, heterocigosidad, etc.), sino también con el fin de relacionar los efectos que sus polimorfismos provocan en los rasgos reproductivos de esta raza.

De esta manera, se ha logrado evidenciar resultados como los determinados en un grupo de vacas Holstein, mediante el análisis del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) (A-320T) del gen FSHR, que la selección a la que fue sometida esta población, no fue lo suficientemente fuerte para generar desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg, ya que no se presentaron diferencias significativas entre heterocigosidad observada ($H_o = 0,504 \pm 0,028$) y esperada ($H_e = 0,466 \pm 0,013$) y que presentaban una tendencia baja a la endogamia, con valores FIS (Coeficiente de endogamia subpoblacional) = 0,285 y FIT (Coeficiente de endogamia total) = 0,328, existiendo gran diversidad en la población, la cual permite a sus individuos responder de mejor forma a diversos retos ambientales (17).

En Holstein chinas, se ha investigado la asociación del polimorfismo de dos SNP de FSHR con el rendimiento a la superovulación, siendo el 51,7% del total de la población homocigotos para A-320T, mientras que el 67,8% fueron heterocigotos para G-278A, teniendo además, los genotipos homocigotos para este último SNP un efecto significativo para el número total de óvulos y de embriones transferibles, concluyendo que este gen se presenta como un potencial marcador que podría predecir la respuesta ovárica a la superovulación (3).

En hatos turcos de Holstein, se examinó la asociación entre los polimorfismos de FSHR y LHR, con la cantidad de inseminaciones artificiales por preñez, informando que los genotipos homocigotos predominaron en este hato para ambos genes, con frecuencias genotípicas superiores al 50% (4).



En poblaciones híbridas de distintos propósitos, se ha estudiado si factores sistemáticos como la selección y los cruzamientos realizados para conformarlas, afectaron la variabilidad en ambos genes. En un grupo de vaquillas híbridas se correlacionó el polimorfismo de FSHR y sus efectos sobre la respuesta a la ovulación múltiple, determinando que los cruzamientos para eliminar las características cebuinas y alcanzar una conformación genética europea, se representó en un 51% de los individuos siendo homocigotos AA para el gen ligado al receptor de FSH, relacionando además a los genotipos heterocigotos con una respuesta menos eficiente a la superovulación (5).

Por lo contrario, en un diferente hato híbrido brasileño en el cual se caracterizó los genes FSHR y LHR, con el fin de determinar su estructura genética, variabilidad de los mismos y el grado de heterocigosis en la población, se encontró un alto porcentaje de heterocigotos para FSHR (58%) y LHR (54%), una diversidad genética total elevada (47%), siendo la diversidad intrapoblacional ($H_S = 46\%$) la responsable de esta variabilidad. Además, se observó que la población no sufría de endogamia con un $FIT = -0,22$ y $FIS = -0,23$, concluyendo que la selección genética aplicada en estos animales no afectó la variabilidad de estos genes, haciéndolos idóneos para cruces con miras a obtener rasgos reproductivos valiosos (6).

De esta forma, el estudio del polimorfismo de los genes FSHR y LHR, en razas especializadas como la raza Holstein, a más de constituir el primer paso en el estudio de la genética poblacional, permite conocer el estado de variabilidad de una población y si la selección u otros procesos tuvieron impacto o no sobre la misma, información necesaria en futuros estudios sobre los posibles efectos que estas variaciones ejercen sobre rasgos reproductivos o en la utilización de variantes alélicas ideales como herramientas de selección genética.

2.1.2 Caracterización de genes ligados a FSHR y LHR en ganado bovino criollo.

Las razas criollas han sido reconocidas por su adaptabilidad a diversos climas, la resistencia a parásitos y enfermedades, excelente aprovechamiento de los nutrientes en pastos pobres, longevidad, productividad, y por sus cualidades reproductivas, este último aspecto ha representado un campo de interés, pues se estima que estas presentan mejores parámetros reproductivos como: inicio de la pubertad, edad al primer parto, intervalo entre partos, tasa de natalidad, etc., basándose en que estas razas poseen y conservan una variabilidad alta e ideal de genes responsables de estos parámetros como FSHR y LHR. Por ende, en estas razas la variabilidad de estos dos genes también han sido objeto de estudio, aunque de forma muy limitada (18, 19).



En una población de ganado Pasundan, una raza local de Java occidental, se estudió si el decremento de su población redujo la capacidad reproductiva del mismo, traducida en la disminución de la variabilidad del gen LHR, encontrando que la población era polimórfica para el mismo, con una heterocigosidad observada (51,3%), superior a la esperada (49,8%), indicando que la variación de este gen era alta, con potencial para ser empleada como marcador genético para la selección en pro del mejoramiento de rasgos de reproducción de este ganado (7).

De la misma manera, en un grupo de bovinos locales Luxi en Beijing, se correlacionó los polimorfismos de FSHR y sus genotipos con los niveles de Estrógeno y las tasas de preñez después de la transferencia de embriones, detectándose el carácter polimórfico del mismo con dos alelos resultantes (G y A) y una proporción de heterocigotos del 47,7%, observando además que ninguno de los genotipos afectaba la tasa de preñez; sin embargo, el genotipo GG tuvo niveles de estrógenos más altos el día de la transferencia (20).

No obstante, también se ha observado monomorfismo en el gen FSHR, como el reportado en tres ecotipos de bovinos locales de Sudán, este carácter monofórmico podría ser un factor para la desensibilización del receptor hacia la FSH, resultando en una transmisión hormonal menos eficiente. Por otro lado para LHR, el 47,5% de esta población fue heterocigota, encontrándose la misma en desequilibrio génico provocado por las fuertes presiones de selección y endogamia (8).

En nuestro país, se ha determinado en distintas razas criollas una alta variabilidad para diferentes locis estudiados. En ganado criollo Macabeo se determinó una amplia diversidad genética, con un alto número promedio de alelos (7,5) y valores de heterocigosidad (>70%), para los locis estudiados y con respecto a razas comerciales como Hereford, Cebú y otras europeas, pero con consanguinidades altas de $0,089 \pm 0,12$ (9). Igualmente, en un estudio realizado en 4 grupos de bovinos criollos en el Cantón Gonzanamá se observó una heterocigosidad del 74%, con un número promedio de alelos de 8,14 por microsatélite estudiado (10), reportándose resultados parecidos en poblaciones criollas de Manabí (11), lo que ha determinado en variedad genética idónea para la implementación de bancos de germoplasma y mantenimiento de núcleos reproductivos para evitar la absorción completa de este tipo de animales por cruces indiscriminados con razas especializadas.



2.2 PARÁMETROS GENÉTICOS POBLACIONALES

Los indicadores como: el número medio de alelos por locus (N_a), las frecuencias alélicas y genotípicas, la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e), el equilibrio de Hardy-Weinberg, los estadísticos F de Wright y las distancias genéticas, son los indicadores más frecuentes en los estudios de caracterización y diversidad genética de una población (11).

2.2.1 Número de alelos por locus (N_a)

Esta medida es el promedio de alelos por locus y nos aporta información complementaria a la obtenida con los polimorfismos, su cálculo únicamente requiere el conteo de alelos detectados por locus y obtener el promedio (10).

2.2.2 Heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e)

La heterocigosidad observada se define como la proporción de heterocigotos, que una población presenta y se obtiene mediante la división del número de individuos heterocigotos de cada locus para el total de individuos analizados. La H_e es la probabilidad de que cuando seleccionamos dos alelos aleatoriamente, en una población en equilibrio, estos sean diferentes. Su cálculo se puede realizar mediante la ecuación: $H_e = \sum_{i=1}^K x_i^2$, donde x_i es la frecuencia del alelo determinado y k es el número de alelos, estos dos parámetros son los más apropiados para estimar la diversidad de un gen en una población (11).

2.2.3 Frecuencias alélicas y genotípicas

Los individuos de una población comparten entre sí un grupo de genes cuyos alelos difieren entre sí, generando individuos con distintos genotipos en la misma población. Por ello, un paso fundamental de la genética poblacional es el cálculo de las frecuencias tanto de los alelos como de los genotipos que de estos resultan, y cómo cambian a través de las generaciones. Es decir, estos parámetros nos permiten observar la proporción con que determinados alelos de un gen y sus respectivos genotipos aparecen en una población, aspectos fundamentales para estudiar la variación genética, distribución de los genotipos o los procesos que afectan la composición de un conjunto de genes y si estos producen divergencia entre poblaciones (21).

2.2.4 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Esta ley que establece que en una población grande que se reproduce mediante apareamientos al azar, que no ha sufrido mutaciones, selección natural, ni migración o flujo génico de poblaciones externas, sus frecuencias alélicas y genotípicas con respecto a un gen o grupo de genes se mantienen constantes a través de las generaciones, encontrándose en equilibrio. Por ende, esta ley constituye una hipótesis nula, pues permite conocer si la estructura genética de una población cambió o no, debido al incumplimiento de estas condiciones para mantener ese equilibrio.



2.2.5 Estadísticos F de Wright

También conocidos como índices de fijación, estos permiten medir las desviaciones de las frecuencias genotípicas de una población al describir estadísticamente el nivel de heterocigosidad de la misma y la proporción esperada de su reducción.

2.2.5.1 Coeficiente de endogamia total (F_{IT}) y de sub poblaciones (F_{IS})

El estadístico FIS indica el nivel de endogamia (consanguinidad) de los individuos de una población al medir la reducción en la heterocigosidad debido a apareamientos no aleatorios. Es decir, cuantifica la probabilidad de que dos alelos de un determinado gen de un individuo sean idénticos, al descender estos de un mismo alelo de un antecesor, mientras que FIT, lo mide en la totalidad de la población (10, 21).

Un método básico para la medición de FIS en un población se basa en la relación inversa que existe entre la consanguinidad y la frecuencia de heterocigotos, pues mientras aumenta el nivel de la primera la frecuencia de heterocigotos disminuye, por ende F se puede calcular mediante la siguiente fórmula (11).

$$F = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

Donde, H_e , es la heterocigosis esperada y H_o es la observada en la población, el resultado puede variar entre -1 y +1. Si F ($F = 0$) presenta un valor negativo, indica exceso de heterocigotos significando que ninguno de los dos alelos de un gen en un individuo, descienden de un mismo ancestro; por el contrario, los valores positivos de F ($F = 1$) indican excesos de homocigotos (10).

2.2.5.2 Coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones (F_{ST})

Permite medir el grado de diferenciación genética entre las poblaciones y asume a la deriva genética como el factor responsable de dicha variabilidad pues ocasiona una pérdida de alelos al azar, generalmente de los menos frecuentes fijando los más frecuentes, y que tiende a eliminar a los genotipos heterocigotos, resultando esto en un cambio de sus frecuencias y una disminución de la diversidad genética de la población (17).

Los valores de F_{ST} varían de 0 a 1, y a comparación del F_{IS} , este no puede tomar un valor negativo. De esta manera un valor $F_{ST} = 0$ indica nula diferencia genética entre las poblaciones estudiadas, con iguales frecuencias alélicas para determinados genes y de manera contraria, un valor de 1 indica diferenciación o aislamiento genético entre las mismas con frecuencias alélicas fijadas y diferentes en las poblaciones (11).



2.2.5.3 Distancias genéticas

Se refiere al grado en que dos poblaciones que tuvieron un mismo origen, pero que históricamente se desarrollaron de manera distinta, divergen o se diferencian entre sus frecuencias alélicas; por ende, ayudan a comprender las relaciones evolutivas entre poblaciones. El cálculo de la distancia genética entre dos poblaciones permite estimar relativamente el tiempo que ha pasado desde que se inició la divergencia (8).

De esta manera, si entre dos poblaciones las distancias genéticas son pequeñas, indican flujo genético entre las mismas o también un completo aislamiento pero que se han separado recientemente, pues mientras menos tiempo dure la divergencia, menor será la diferencia entre sus frecuencias génicas (10).

2.2.6 Alelos nulos

Los alelos nulos o silentes son aquellos que están presentes en el ADN pero que no son amplificados mediante PCR, ya sea por factores extrínsecos como problemas técnicos, o intrínsecos como la presencia de variaciones o mutaciones en su secuencia o regiones de hibridación de los primers, generando un fracaso en la amplificación ya sea de uno o ambos alelos de un locus. Su presencia produce subestimación de heterocigosidad que podría tener posibles efectos sobre los análisis genéticos (22).

2.3 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA MOLECULAR

Esta herramienta que nos permite conocer las características genéticas de una población, se basa en el análisis de polimorfismos en marcadores de ADN y se trata del método más rápido y rentable para estimar la variación genética a nivel de poblaciones. Este proceso comprende la recolección de muestras biológicas (sangre y/o folículos pilosos), de las que se extraen ADN, el cual se somete a ensayos de laboratorio como el secuenciado o genotipado (15). Por ende, el uso de los marcadores genéticos se ha justificado, pues nos permite el cálculo de los parámetros genéticos como los genotipos, heterocigosidad, número de alelos, frecuencias alélicas y genotípicas y el equilibrio génico de las poblaciones, necesarios para el estudio de la variabilidad genética (10).

2.4 MARCADORES GENÉTICOS BASADOS EN POLIMORFISMOS

Los marcadores genéticos son regiones específicas de ADN de un gen o fragmentos de ADN sin función conocida, que poseen carácter polimórfico (con variaciones neutras o funcionales), cuya ubicación en el cromosoma se conoce y que se heredan de forma codominante, junto a los genes con los que se encuentran relacionados o cercanos, por lo que se constituyen en puntos de referencia para su localización y estudio (15) Estas características son idóneas para estudios de caracterización de la diversidad y variabilidad genética intra e inter poblacionales y en la búsqueda



de diversos alelos o variantes funcionales de determinados genes de importancia, permitiendo cuantificar sus frecuencias genotípicas y alélicas en dichas poblaciones (23).

2.5 TIPOS DE MARCADORES DE ADN HABITUALES

2.5.1 Marcadores basados en polimorfismos con repeticiones en tándem (VNRT)

Un gran porcentaje del genoma se encuentra conformados por secuencias cortas de ADN que se repiten, las mismas que varían según el número de sus repeticiones o la composición de sus nucleótidos. Tenemos los: micro satélites o SSR (secuencias simples repetidas), son de tamaño pequeño, entre 2 a 6 pares de bases, se encuentran diseminados por todo el genoma, son muy polimórficos y generan decenas de alelos de un mismo locus o gen, por ende continúan siendo elegidos para estudios de diversidad, estructura genética de poblaciones y estudios de migración; y los mini satélites los cuales se diferencian de los primeros en la longitud de sus repeticiones, entre diez y varios centenares de pares de bases (15, 24).

2.5.2 Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)

Son polimorfismos originados por variaciones en secuencias de ADN de entre cuatro a ocho ácidos nucleicos que se encuentran en un gen, ya sea en intrones o exones, o entre ADN existente entre genes, que varían entre individuos y son reconocidos por una enzima de restricción, que se une a estas y las corta (24). Actualmente se los emplea conjuntamente con la PCR (PCR-RFLP), como marcadores de localización en el ADN, lo que permite detectar diferentes alelos de genes que varían en su secuencia, permitiendo diferenciar entre individuos heterocigotos y homocigotos, aspectos necesarios en el estudio de la composición y variabilidad genética de una población de estudio (25).

2.5.3 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

Son marcadores de nueva generación, representan el más común y amplio tipo de variaciones encontradas en el genoma. Estos consisten en variaciones de un solo nucleótido en la secuencia de ADN. Se encuentran más frecuentemente en intrones (regiones no codificantes), y en menor medida en los exones codificantes, en los cuales el cambio de un solo nucleótido de la secuencia ya sea transiciones (Purina por Purina o Pirimida por Pirimida) o transversiones (Purina por Pirimida y viceversa) pueden producir variantes funcionales como por ejemplo cambios en aminoácidos puntuales de las proteínas resultantes, que podrían afectar la función de las mismas, producir enfermedades o mayor susceptibilidades a las mismas, de allí la importancia de los estudios de asociación genética con estas variaciones (24, 26).



2.6 IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS

Actualmente se disponen de técnicas basadas en marcadores genéticos que permiten identificar y evaluar las diferencias o polimorfismos a nivel de ADN, aportando información importante sobre la composición genética de individuos específicos o poblaciones enteras con respecto a determinados genes responsables de características importantes (16).

2.6.1 PCR-RFLP

Este método se basa en la detección de variaciones en las secuencias de ADN, específicamente en el sitio de escisión del mismo. La identificación de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), se realizan mediante enzimas de restricción o endonucleasas que reconocen y cortan regiones específicas de ADN que previamente fueron amplificadas mediante PCR (27). Estos fragmentos digeridos, se resuelven mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, para su visualización. La presencia de variaciones en la secuencia altera el sitio de corte dando como resultado la presencia o ausencia del mismo, o fragmentos de diferente tamaño o peso. Esta técnica es de gran utilidad para detectar alelos que un determinado gen posee, cuyas variaciones secuenciales determinarán la presencia o no de un sitio de corte permitiendo la diferenciación entre individuos (24).

2.6.2 PCR

Para el estudio de los alelos de un gen o determinado segmento de ADN es necesario obtener miles de copias de los mismos, esto se realiza mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR), que permite amplificar dichos segmentos con la ayuda de secuencias de nucleótidos iniciadoras denominadas cebadores o primers y que posteriormente es completada mediante la enzima ADN polimerasa (11).

El principio del método se basa en realizar tres pasos sucesivos a distintas temperaturas, cuyo componente principal es la enzima ADN polimerasa aislada de *Thermus aquaticus*, microorganismo adaptado a la supervivencia a muy altas temperaturas. El primer paso consiste en la desnaturalización del ADN a una temperatura de 90 a 95 °C con el fin de separar las dos cadenas complementarias que servirán como plantilla, a continuación se produce la hibridación o unión de los cebadores específicamente diseñados, derivados de genes de interés o de secuencias obtenidas de bases de datos, de tal manera que se complementen con la cadena molde de ADN desnaturalizado y que definan con exactitud el tramo de ADN a replicar, proceso realizado a una temperatura de 45 a 65 °C, finalmente se complementa la secuencia iniciada por los primers, mediante la enzima ADN polimerasa a una temperatura en la que esta ejerce su función a 72 °C en



el caso de la Taq-polimerasa. Estos tres pasos se pueden repetir entre 25 a 45 veces (ciclos), para generar un crecimiento exponencial y obtener suficientes amplicones (10, 15, 21).

2.6.3 Digestión y fraccionamiento del ADN

En muchas ocasiones los fragmentos de ADN obtenidos suelen ser muy grandes, por ende, se emplean enzimas de restricción también conocidas como endonucleasas de restricción, que permiten obtener fragmentos de tamaño apropiado, estas enzimas son de origen bacteriano en donde sirven para digerir ADN foráneo como el viral, protegiéndolas de su infección. Estas reconocen secuencias específicas (palíndromos) de ADN (sitios de restricción), uniéndose y cortando las mismas. Existen varias enzimas de restricción como: HpaII; HaeIII; EcoRI o NotI, y su elección depende del sitio de corte para obtener un fragmento específico, es gracias a estas características que se las emplea para detectar polimorfismos en las secuencias objetivo, permitiendo la diferenciación poblacional (21, 24).

2.6.4 Electroforesis

Es una técnica físico-química que permite separar las moléculas según la carga eléctrica o su peso molecular, permitiendo la visualización de las mismas. En el caso del ADN, este es de carga negativa debido a los grupos fosfato que posee en los enlaces, al cargar el ADN sumergido en una sustancia tampón, en pocillos con geles de agarosa o poliacridamida, este medio se electrifica y se produce la migración del ADN, desde el polo negativo al ánodo (27). Los poros que contienen los geles actúan como coladores permitiendo que los fragmentos pequeños migren rápidamente y una mayor longitud, mientras que con los grandes fragmentos ocurre lo contrario. Esta técnica es muy importante en la investigación de polimorfismos, pues cuando estos existen los fragmentos visualizados pueden ser más o menos largos, o cuando se emplea la técnica PCR-RFLP, nos permite observar la presencia o no de bandas, generada según la existencia o no de los sitios de restricción en la secuencia analizada (11).



CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio

Las muestras de ADN utilizadas formaron parte de la investigación: “*Caracterización genotípica del ganado criollo de tipo Ibérico de la provincia del Azuay*” (Código del proyecto: *DIUC_XIV_2016_015*), obtenidas a partir de muestras sanguíneas, provenientes de bovinos fenotípicamente considerados criollos de hatos localizados en Dugdug, Paute, El Pan, Tarqui, Huachi, Trigo Pampa y Girón, y de bovinos Holstein pertenecientes a tres hatos ubicados en la misma provincia del Azuay, las mismas permanecen almacenadas en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, en el cual se realizó el análisis para la caracterización genética de FSHR y LHR, mediante PCR-RFLP.

3.2 Amplificación y visualización de los productos de PCR específicos (FSHR, LHR)

3.2.1 Biológicos

Muestras de ADN almacenadas (200 ng de ADN por muestra) pertenecientes al ganado bovino de raza Holstein y Criollo.

3.2.2 Reactivos y Soluciones

- **Agua grado biología molecular:** (Sigma, Cat. No.: W4502); se preparó alícuotas de 1 ml y se almacenó a temperatura ambiente, protegida del polvo.
- **Enzima Taq ADN polimerasa:** Enzima Taq ADN polimerasa con el Tampón 10X de amplificación y Solución de MgCl₂ (Invitrogen, Cat. No: 10966-033).
- **Solución de dNTP's (Desoxinucleotidos trifosfatados)** (dNTP's set, Thermo-Scientific, Cat. No: R0182).
- **Set de primers:** Específicos para la amplificación de FSHR y LHR, almacenados a solución - 20 °C, y protegida de la luz directa (Invitrogen) (28).

Tabla 1. Descripción de los marcadores de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) analizados. F(forward)= dirección 5´-3´; R(reverse)=dirección 3´-5´. LHR=receptor de la hormona luteinizante; FSHR=receptor de la hormona folículo estimulante.

Gen	Secuencia	Tamaños de los productos PCR obtenidos
FSHR	F: CTGCCTCCCTCAAGGTGCCCTC R: AGTTCTTGGCTAAATGTCTTAGGGG	306 bp
LHR	F: CAAACTGACAGTCCCCGCTTT R: CCTCCGACCATGACTGGAATGGC	303 bp



- **Agarosa** (Invitrogen, Cat.No. 16500-100).
- **Solución tamponada TAE IX:** Solución a 40 mM Tris-acetato, pH \approx 8.0 (Sigma, Cat. No: T4661) y 1 mM EDTA (Sigma, Cat. No.: EDS).
- **Solución de Bromuro de Etidio:** Solución a 10 mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma, Cat. No: E7637)
- **Solución tamponada de carga para ADN 6X:** Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0 (Sigma, Cat. No: T4661); 60 mM de EDTA (Sigma, Cat. No.: EDS). 0.03% de Azul de Bromofenol (Sigma, Cat. No: B8026); 0.03% de Xilencianol (Sigma, Cat. No: X4126) y 60% de Glicerol.
- **Marcador de peso molecular para ADN** (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No: SM0321).

3.2.3 Equipos y otros materiales

- Micropipetas (De diferentes volúmenes) (1 ml, 200 μ l, 20 μ l y 10 μ l con puntas estériles).
- Vortex.
- Nanocentrífuga.
- Cabina de PCR.
- Termociclador. Nexus (Eppendorf).
- Congelador a -20 °C, sin descongelamiento automático (Almacenado de enzimas y algunos otros reactivos).
- Fuente de poder.
- Cámara de electroforesis horizontal.
- Balanza (Mantener calibrada).
- Horno de microondas.
- Transiluminador UV.
- Fotodocumentador UV- Impresora.
- Potenciómetro (pHmetro).
- Platina de agitación y calentamiento.



3.2.4 Método

Paso N° 1. Se descongeló en hielo los reactivos necesarios para la amplificación (Agua grado biología molecular, Solución tampón de amplificación 10X, Solución de $MgCl_2$, Solución de dNTP's, Soluciones de oligonucleótidos y las Soluciones de ADN total correspondientes a las muestras a analizar).

Una vez descongelados todos los reactivos necesarios, se preparó la premezcla en el volumen requerido para el número de muestras a analizar, colocándolos en el orden indicado los siguientes reactivos (Tabla 2).

Tabla 2. Mezcla de reacción PCR para LHR y FSHR. 40 muestras.

Reactivo	Volumen	
	de premezcla	por reacción
Agua grado Biología Molecular	636 μ l	15,9 μ l
Buffer de amplificación 10X	100 μ l	2,5 μ l
Solución enhancer 10X	100 μ l	2,5 μ l
Solución $MgSO_4$	40 μ l	1 μ l
Solución dNTP's	20 μ l	0,5 μ l
Oligonucleótico Forward	8 μ l	0,2 μ l
Oligonucleótico Reverse	8 μ l	0,2 μ l
Enzima Pfx ADN polimerasa	8 μ l	0,2 μ l
Muestra de ADN total	80 μ l	2 μ l
Volumen Final	1000 μ l	25 μ l

Paso N° 2. Se tomó los tubos de PCR (200 μ l) requeridos y se identificó de manera adecuada cada uno de ellos.

Paso N° 3. Se colocó según corresponda en cada tubo de PCR 2 μ l de la solución ADN total de las muestras a analizar. El volumen total debe ser colocado en el fondo del tubo evitando tocar las paredes del mismo mientras es dispensado con las micropipetas.

Paso N° 4. Se adicionó a la premezcla 8 μ l de la Solución de la enzima Taq ADN polimerasa, se procedió a mezclar en vortex por 3 segundos, colectando todo el volumen con una breve centrifugación.

Paso N° 5. Se dispensó un volumen 23 μ l de la premezcla en cada uno de los tubos de PCR a los que se les colocó la correspondiente solución de ADN a la premezcla, evitando tocar la solución de ADN previamente colocada en cada uno de los tubos.

Paso N° 6. Se homogenizó en vortex el contenido de los tubos de PCR y se colectó el volumen total por centrifugación en la picofuga.



Paso N° 7. Se colocó los tubos en el Termociclador previamente programado con el perfil de temperatura correspondiente, antes de iniciar la actividad del termociclador se cercioró que los tubos estén bien cerrados.

Paso N°8. Una vez concluido el proceso de amplificación, se retiraron los tubos del Termociclador, y se procedió inmediatamente al análisis de los productos generados mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE.

Paso N° 9. Para la electroforesis de los amplicones obtenidos se preparó un gel grande de agarosa al 1,5%, adicionando 1,35 g de agarosa en 90 ml de solución TAE (Tris-Acetato-EDTA) AL 1X, disolviendo completamente en el horno microondas hasta obtener una composición homogénea y transparente.

Paso N° 10. Se enfrió ligeramente la solución de agarosa-TAE, posteriormente se le añadió 3 microlitros de Bromuro de Etidio.

Paso N° 11. Se vertió el gel en la cámara horizontal de electroforesis, previamente armada, esperando hasta que gelifique, se colocó el volumen suficiente de la solución TAE y se retiró posteriormente el peine para formación de los pocillos en el gel y demás aditamentos de la cámara.

Paso N° 12. Se colocó en cada uno de los pocillos 5 μ l de la muestra previamente mezclada con 2-3 μ l de la solución tamponada de carga 6X. En el pozo número 15, se colocó 5 μ l de la Solución del marcador de peso molecular de 100 bp.

Paso N°13. Una vez concluida la carga del marcador de peso molecular y las muestras, se ensambló el circuito eléctrico de la cámara de electroforesis con la fuente de poder, posteriormente se inició a electroforesis (80 V, por 40 minutos).

Paso N° 14. Conseguido el resultado deseado en la resolución de los productos de PCR en la electroforesis, se procedió a documentar la imagen del gel en el Fotodocumentador e imprimir la fotografía para generar un respaldo físico del resultado.



3.3 Materiales a usarse en los ensayos RFLP de los productos de PCR específicos (FSHR y LHR) y la visualización de los mismos.

3.3.1 Biológicos

Ensayos de los polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) de los productos de PCR específicos de cada una de las muestras a analizarse.

3.3.2 Reactivos y soluciones

- **Soluciones de los productos de PCR:** Amplificadas de cada una de las muestras de ADN total. Se almacenó a -20 °C, protegidas de la luz directa.
- **Enzimas de restricción:** HhaI (Thermo Scientific. No. Cat: ER1851) y AluI (Thermo Scientific No. Cat: ER001) para LHR y FSHR, respectivamente. Con sus soluciones tamponada de reacción 10X.
- **Dodecil sulfato de sodio (SDS)** (Sigma, Cat. No.: 71725)
- **Agarosa** (Invitrogen, Cat.No. 16500-100).
- **Solución tamponada TAE IX:** Solución a 40 mM Tris-acetato, pH \approx 8.0 (Sigma, Cat. No: T4661) y 1 mM EDTA (Sigma, Cat. No.: EDS).
- **Solución de Bromuro de Etidio:** Solución a 10 mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma, Cat. No: E7637)
- **Solución tamponada de carga para ADN 6X:** Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0 (Sigma, Cat. No: T4661); 60 mM de EDTA (Sigma, Cat. No.: EDS); 0.03% de Azul de Bromofenol (Sigma, Cat. No: B8026); 0.03% de Xilencianol (Sigma, Cat. No: X4126) y 60% de Glicerol.
- **Marcador de peso molecular para ADN:** (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No: SM0321).

3.3.3 Equipos y otros materiales

- Micropipetas (De diferentes volúmenes) (1 ml, 200 μ l, 20 μ l y 10 μ l con puntas estériles).
- Vortex.
- Nanocentrífuga.
- Congelador a -20 °C, sin descongelamiento automático, (almacenado de enzimas y algunos otros reactivos).
- Fuente de poder
- Cámara de electroforesis horizontal.
- Balanza (Mantener calibrada).
- Horno de microondas.
- Transiluminador UV.
- Fotodocumentador UV –Impresora.



- Potenciómetro (pHmetro).
- Platina de agitación y calentamiento

3.3.4 Método

Paso N° 1. Se adicionó a los productos de PCR (8 μ l), 1 μ l de la enzima de restricción correspondiente, se mezcló en vortex brevemente (3-5 seg), y luego se colectó el volumen total de la reacción centrifugándola por 3 a 5 seg.

Paso N° 2. Se colocó inmediatamente las reacciones en la incubadora bacteriológica a 37°C durante 1-2 horas.

Paso N° 3. Una vez concluido el proceso de digestión, se adicionó a cada una de las reacciones 2 μ l de la Solución tamponada de carga de muestras de ADN 6X, y se homogenizó en vortex brevemente (3-5 seg), colectando el volumen total de la reacción centrifugándola por 3-5 seg. Para el caso de los amplicones de FSHR digeridos, al Buffer de carga se le añadió SDS, que permitió la desnaturalización de las proteínas, en este caso de la enzima AluI, calentándolos posteriormente durante 10 min a 57 °C, esto con el fin de permitir una mejor visualización de los amplicones digeridos

Paso N° 4: Se procedió a realizar la electroforesis en gel grande de agarosa al 1,5% y la documentación de su imagen, se siguieron los procedimientos descritos anteriormente.

3.4 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, empleando un total de 60 muestras de ADN; 30 muestras de animales de raza Holstein y 30 de raza Criolla, tomadas al azar, esta cantidad se considera suficiente para obtener un panorama confiable de los caracteres distintivos de la raza y su diversidad (15). Cada una de estas fue sometida al procedimiento de PCR-RFLP, específico para el estudio de FSHR y LHR.

Con los datos obtenidos por el análisis en el laboratorio, se realizó las estimaciones de los parámetros genéticos tanto para el gen FSHR y LHR, en ambas poblaciones bovinas de estudio. Los parámetros genéticos poblacionales determinados fueron: el número total de alelos (N_a); las frecuencias alélicas y genotípicas; heterocigosis observada (H_o) y esperada (H_e); el coeficiente de endogamia total (FIT) y poblacional (FIS); el número de alelos nulos; el cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg y las distancias genéticas entre estas dos razas, mediante los programas Genepop y Genetix. Las desviaciones del número de genotipos observados de los genotipos esperados se evaluaron mediante la prueba de Chi-cuadrado.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 Ensayo PCR-RFLP

La amplificación de los genes FSHR y LHR, mediante PCR, produjo fragmentos de 306 bp y 303 bp respectivamente (Figura 1 y 2).

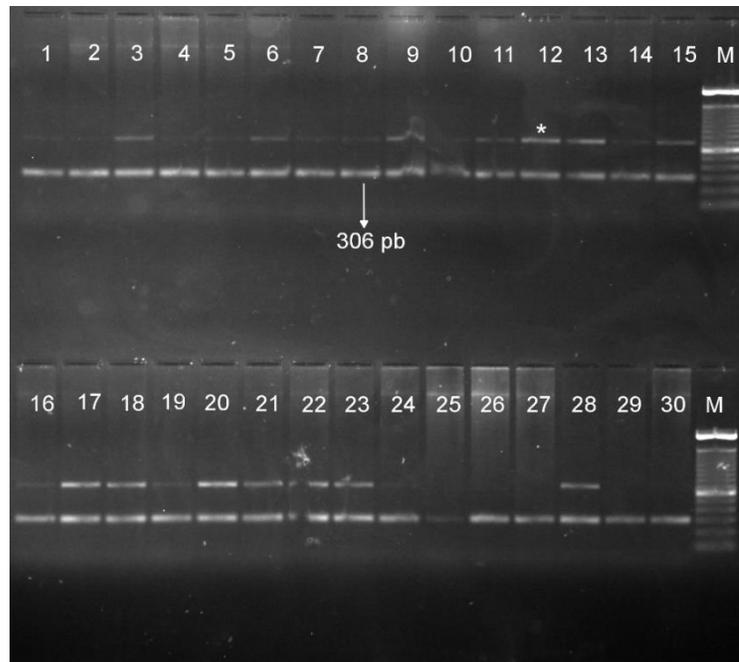


Figura 1. Fragmentos amplificados del gen FSHR. Carril (M): marcador de peso molecular 100 bp (Thermo scientific Cat. No: SM0321). Carriles (1-30): producto de amplificación de 30 animales Criollos. Artificios (*).

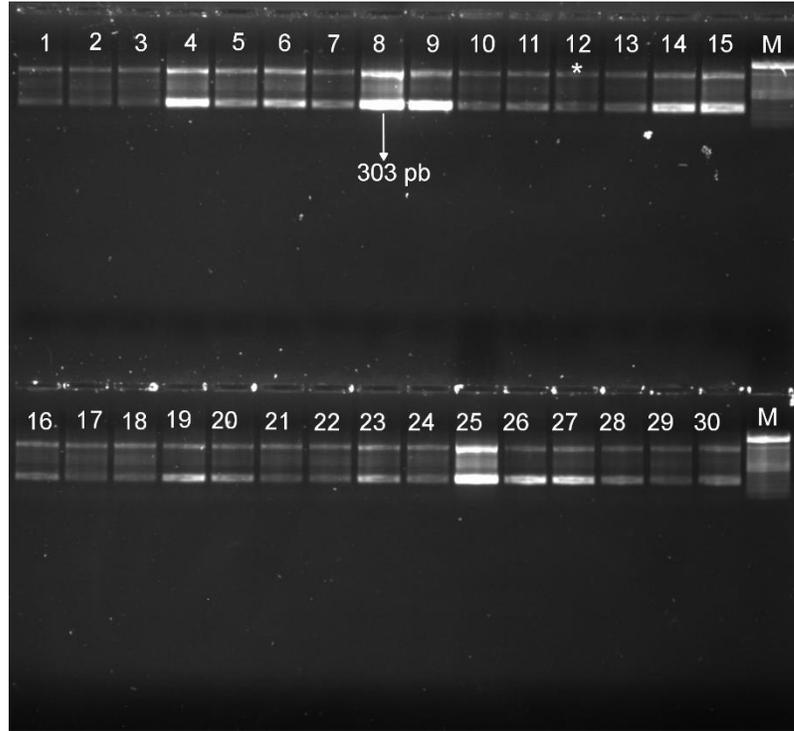


Figura 2. Fragmentos amplificados de 303 bp del gen LHR. Carril (M): marcador de peso molecular 100 bp (Thermo scientific Cat. No: SM0321). Carriles (1-30): producto de amplificación de 30 animales Holstein. Artificios (*).

Los fragmentos RFLP esperados post digestión de los amplicones de PCR obtenidos, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Fragmentos RFLP y genotipos esperados para FSHR y LHR.

Gen	Fragmentos RFLP esperados (AluI)			Genotipos esperados	
FSHR	C	G	CC	CG	GG
Peso molecular (bp)	243	193	243	243 193	193
Gen	Fragmentos RFLP esperados (HhaI)			Genotipos esperados	
LHR	T	C	TT	TC	CC
Peso molecular (bp)	303	155/148	303	303 155/148	155/148

Mediante la enzima de restricción Alul, se evidenció la presencia de dos alelos para el gen FSHR: C y G, dando como resultado genotipos CC, CG en ambas poblaciones y GG, observado únicamente en el ganado Holstein (Fig. 3 y 4), mientras que para LHR la digestión con HhaI permitió identificar la presencia de un único alelo: C, en ambas razas (Fig. 5).

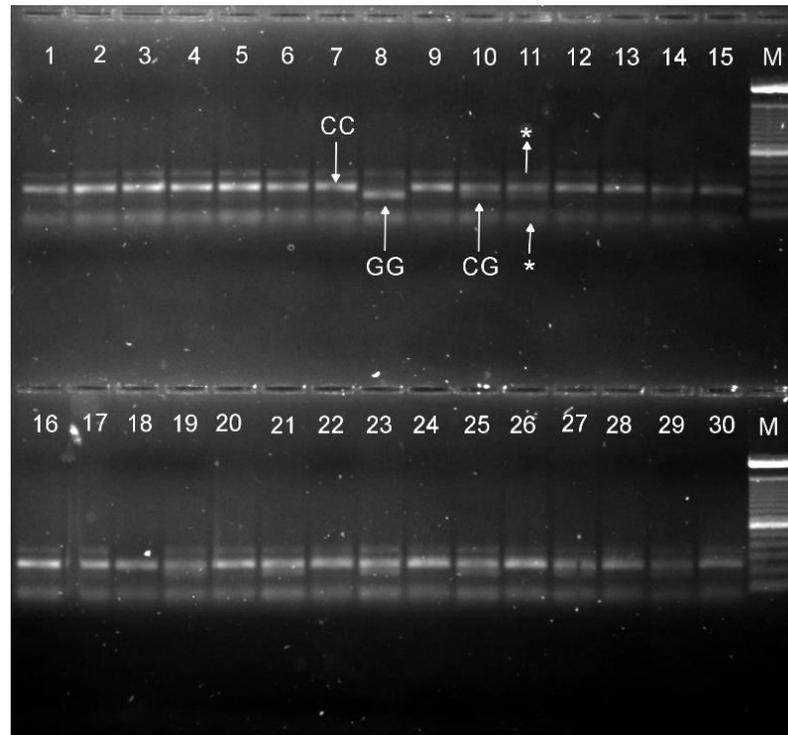


Figura 3. Productos de la digestión del gen FSHR mediante PCR-RFLP - HOLSTEIN. Genotipos: CC, GG y CG. M: marcador de peso molecular 100 bp (Thermo scientific Cat. No: SM0321). Artificios (*).

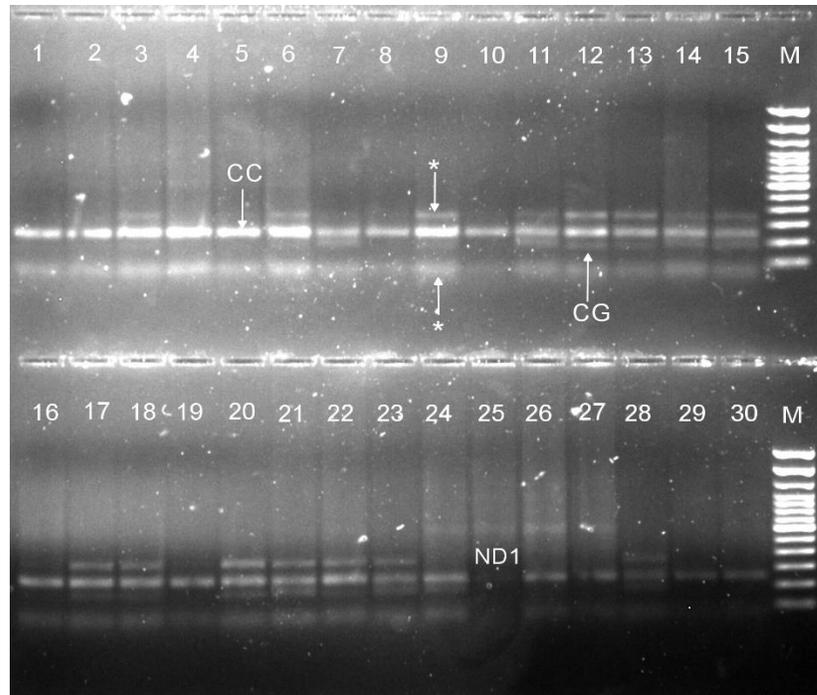


Figura 4. Productos de la digestión del gen FSHR mediante PCR-RFLP-CRIOLLOS. Genotipos CC y GG. ND1: producto no digerido. M: marcador de peso molecular 100 bp (Thermo scientific Cat. No: SM0321). Artificios (*).

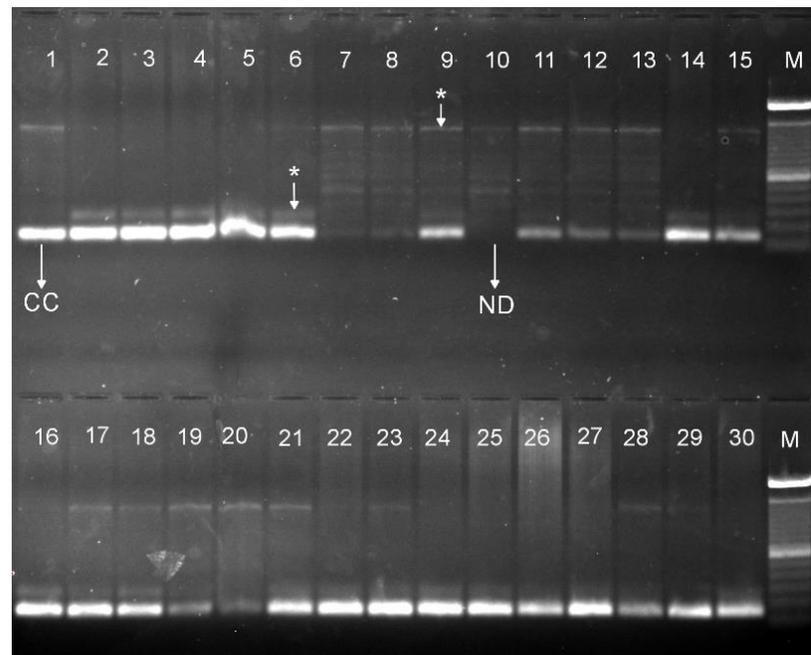


Figura 5. Productos de la digestión del gen LHR mediante PCR-RFLP-CRIOLLOS. Genotipo CC. M: marcador de peso molecular 100 bp (Thermo scientific Cat. No: SM0321). ND: muestra no digerida. Artificios (*)

4.2 Parámetros genéticos

4.2.1 Frecuencias alélicas y genotípicas

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los genes FSHR y LHR, se obtuvieron mediante recuento directo y se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas de los genes FSHR y LHR en ganado Holstein y Criollo.

Gen	Grupos	Frecuencias alélicas (%)		Frecuencias genotípicas (%)		
		C	G	CC	CG	GG
FSHR	HOLSTEIN	82	18	67	30	3
	CRIOLLO	72	28	45	55	0
	PROMEDIO	77	23	56	42,6	1,5
LHR		T	C	TT	CT	CC
	HOLSTEIN	0	100	0	0	100
	CRIOLLO	0	100	0	0	100
	PROMEDIO	0	100	0	0	100

Tanto en el total de la población como en el análisis por razas se evidenció un mayor predominio del alelo C para el locus FSHR y, por ende, un mayor porcentaje de individuos homocigotos CC, sin embargo, la raza criolla presentó valores menores de estos genotipos, en comparación con la alta frecuencia de los mismos en el ganado Holstein. Este panorama se revierte al comparar las frecuencias de heterocigotos CG, entre ambas razas. A su vez, se observó que el alelo encontrado para LHR se encuentra fijado en ambas sub poblaciones.

4.2.2 Heterocigosidad observada y esperada.

Para el locus FSHR se observó mayor heterocigosidad en la raza Criolla, más del 0,10, con respecto al ganado Holstein, además en esta raza la heterocigosidad observada (H_o) fue mayor que la esperada (H_e) ($0,5517 > 0,3995$), lo que igualmente indica una mayor heterocigosidad en la misma en comparación al ganado Holstein (Tabla 5).

Tabla 5. Heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) en el gen FSHR. H_o = Heterocigosidad observada; $H_n.b$ = Heterocigosidad sin sesgo; H_e = Heterocigosidad esperada.

	Heterocigosidad	
	Holstein	Criollo
H_o	0,3000	0,5517
$H_n.b.$	0,3045	0,4065
H_e	0,2994	0,3995

4.2.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg

La probabilidad de equilibrio de Hardy-Weinberg se obtuvo mediante la prueba chi-cuadrado (χ^2), a través de las frecuencias genotípicas observada y esperadas, considerando que valores P no significativos ($p > 0,05$), aceptan la hipótesis nula (H_0), encontrándose la población en equilibrio génico, mientras que valores significativos la rechazan.

Para el locus FSHR, no existió diferencia significativa ($p = 0,9049 > 0,05$) entre el total de la población observada y esperada, por lo tanto, la misma se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg para dicho gen.

4.2.4 Estadísticos F de Wright

Se analizó el nivel de consanguinidad total de la población (FIT), de cada sub-población (FIS) y la diferenciación genética entre estas dos (FST), mediante el cálculo de los estadísticos de F Wright. Los valores FIS, fueron obtenidos mediante dos métodos (Weir & Cockerham 1984 y Robertson & Hill 1984), pues nos permiten corregir los problemas derivados del tamaño de la muestra y el número de subpoblaciones muestreadas (22).

En el ganado Criollo no se observó existencia de consanguinidad, pues su valor FIS fue de -0,37 mediante los dos métodos anteriormente mencionados (Tabla 6). Mientras que para la raza Holstein este valor no fue significativamente diferente de cero, de hecho, sus intervalos de confianza muestran que es posible encontrar valores de hasta 0,20 en esta raza, lo que indica una consanguinidad nula o muy baja en la misma. Estos resultados conjuntamente con el estadístico FIT negativo (Tabla 7) nos indican una población no endogámica con exceso de heterocigotos para el locus FSHR.

Tabla 6. Estadístico FIS FSHR. IC: Intervalo de confianza. W&C: Weir & Cockerham. R&H: Robertson & Hill.

Raza	Estadístico FIS			
	W&C	R&H	Valor medio	IC 95%
Holstein	0,015	0,015	0,01509	(-0,20833 - 0,23684)
Criollo	-0,366	-0,37	-0,36585	(-0,43590 - -0,24444)



El índice de diferenciación genética entre las dos poblaciones estudiadas (F_{ST}) fue de 0,01053, indicando una diferenciación genética pequeña entre estas dos razas (Tabla 7). Concluyendo que las frecuencias alélicas para el locus FSHR son iguales en ambas razas.

Tabla 7. Estadísticos F de Wright para el locus FSHR en ganado Holstein y Criollo.

Raza	Estadístico	
	FIT	FST
Holstein	-0,18626	0,01053
Criollo	-0,18626	0,01053
Ambos	-0,18626	0,01053

4.2.5 Distancias genéticas

Se calculó la distancia genética según Nei 1972, para tamaños de muestra pequeñas, para FSHR, entre ambas poblaciones, y se obtuvo un valor de 0,010; indicando que ambas razas no se encuentran muy distantes para este locus lo que puede deberse a su origen europeo continental común.

4.2.6 Alelos nulos

En la raza Holstein se evidenció la presencia de alelos nulos para el locus FSHR, con una frecuencia moderada de 0,1826; mientras que para la raza Criolla no se evidenció la presencia de los mismos.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

En diferentes razas bovinas, se han reportado el carácter polimórfico del gen FSHR por la existencia de variantes alélicas para el mismo. En híbridos brasileños Cebú x *Bos taurus*, se informó la presencia de tres genotipos: CC (243 bp, 63 bp); CG (243 bp, 63 bp y 193 bp) y GG (193 bp, 50 bp) (28), estos genotipos, pero sin la presencia de las bandas de 63 bp y 50 bp fueron observados tanto en vacas turcas (4), como en las presentadas en este estudio. A su vez, en ganado de carne mexicano de origen brasileño se determinó la presencia de los genotipos: AA (243, 63 bp); AB (243, 63 bp y 306 bp), mayormente observados en *B. indicus* e Híbridos (Cebú x Europea) y CC (243 bp, 150 bp), solamente observados en *B. taurus* (Suizo Europeo) (5), mientras que en vacas cebú sudanesas autóctonas únicamente se observó el genotipo CC (243 bp y 63 bp)(8). La presencia del alelo C, reportado tanto en el ganado híbrido brasileño (Cebú/ Europeo), en el ganado sudanés, y en menor frecuencia en el Suizo europeo, pues este último se formó a partir de ganado Cebú, sugiere a dicho peso molecular, como característica del ganado Cebú centro y sudamericano, originado por cruces entre sus ancestros importados de España e India (en el caso del ganado sudanés) (8, 29, 30).

Las frecuencias genotípicas para FSHR revelaron una mayor frecuencia del alelo C (>70%) y por ende de animales homocigotos CC en el total de la población. En el análisis por razas, el ganado Holstein presentó mayor porcentaje de estos individuos, sin embargo, en el ganado Criollo más del 50% de su población fueron heterocigotos CG. En otros hatos Holstein se han presentado porcentajes similares de homocigotos CC (65.2%), y con una frecuencia del alelo C del 78.8% (4), mientras que en cebús autóctonos sudaneses se ha identificado el carácter monomórfico del gen, con un 100% de animales homocigotos CC (8).

En ganado cárnico compuesto (Cebú x *B. taurus*) se ha presentado valores parecidos entre las frecuencias de homocigotos y heterocigotos, en una de estas poblaciones se calculó un 58% de animales heterocigotos CG, con frecuencias similares entre sus alelos C (48%) y G (51%), siendo aquellos animales conformados de 50% de Cebú y 50% europeo los que mayor porcentaje de estos individuos presentaron (6); mientras que en una diferente población con características de composición parecidas, se evidenció un 51% de homocigotos CC para este gen (5). De esta manera se puede asumir que los altos valores del genotipo CC del ganado Cebú sudanés y las frecuencias moderadas de los mismos en híbridos de cebú, indica una presencia del genotipo *B. indicus* de fuerte a moderada en estas razas.



Un aspecto importante a considerar en la raza Criolla es que la misma se originó a partir de razas Ibéricas traídas al continente por los colonizadores, que se formaron y adaptaron a diferentes regiones por más de 300 años; sin embargo, desde el siglo XVIII se comenzó con la introducción de razas europeas y posteriormente cebuínas desde la India, las cuales se cruzaron con las razas locales sustituyendo en parte el aporte original de las razas ibéricas, de cierta manera esto explica la fuerte presencia del genotipo *B.indicus*, en esta raza, observada por el predominio del alelo C para el locus FSHR (31).

En el ganado Holstein a su vez se debe tomar en cuenta la existencia de alelos nulos para FSHR, puesto que su presencia produce un decaimiento alélico, en donde los individuos heterocigotos que poseen un alelo nulo sean genotipificados como falsos homocigotos, produciendo una subestimación de la heterocigosidad que podrían tener posibles efectos sobre los análisis genéticos (22).

Para LHR, el total de la población fue homocigota para el alelo C, reportándose en otros hatos Holstein frecuencias altas de estos individuos (97,6%) (4). Por otra parte, en razas compuestas se ha observado que las frecuencias de homocigotos y heterocigotos varían de acuerdo al porcentaje de razas de las que están conformadas, por ejemplo, aquellas compuestas de 25% Cebú x 50% Adaptado al trópico x 25% Europea presentaron valores promedio de homocigotos CC del 55%; mientras que en aquellas con 50% Cebú y 50% Europeo, el 75% fueron heterocigotos para este gen y con frecuencias para el alelo C superiores al 50% (6). Por su parte, en ganado autóctono como el Pasundan, un tipo de ganado indígena indonesio, originado por cruces entre *Bos javanicus* (ganado de Bali con introgresión de Cebú) y *Bos indicus* (Ongole y Madura) se observó polimorfismo para LHR, con un 51.3% de animales heterocigotos para el SNP g.1337 C>T (7), valores cercanos a los presentados en ganado indígena sudanés con el 47.50% heterocigotos CT (155/148 y 303 bp) (8), demostrando la importancia de este tipo de cruces entre razas con diferentes composiciones raciales, entre ellas *B. indicus*, generando de esta manera, óptima diversidad y/o variabilidad genética, situación no evidenciada en la población de este estudio, por el carácter mono mórfico observado para este gen (7, 8, 32, 33).



Considerando el locus FSHR, y que valores de heterocigosidad superiores al 50% indican una alta variación de un gen (7), el ganado Criollo presentó una elevada variabilidad genética, pues la heterocigosidad observada fue superior a la esperada ($H_o = 0,5517 > H_e = 0,3995$), mientras que la población Holstein, presentó una variabilidad moderada para este mismo locus, encontrándose además, el total de la población en equilibrio genético para este gen ($p = 0,9049 > 0,05$). Valores similares o superiores al 50% de H_o , fueron también observados en Holstein antioqueñas (50,4%) y ganado cebú-europeo (59%) (2, 6), indicando la alta variabilidad de este gen en distintas razas. Sin embargo, para ambos genes, el total de la población no se encuentra en equilibrio de HW, desequilibrio originado por el carácter monomórfico de LHR.

Los valores negativos de FIT (-0,18626) y FIS (-0,370) en Criollo y valores no significativos en Holstein, permitieron caracterizar a esta población como no endogámica para FSHR, situación óptima considerando la gran población de esta última raza tanto en la provincia del Azuay, como en el país, de hecho, sus intervalos de confianza demostraron que es posible encontrar valores de FIS de hasta 0,20. En Holstein colombianas, igualmente se ha observado una tendencia baja a la endogamia con valores FIS= -0,285 y FIT= -0,328 (17), por otra parte, se pudo evidenciar que cruces entre *B. indicus* y *B. taurus*, genera una gran diversidad genética y una muy baja tendencia a la endogamia (FIT = -0,22 y FIS = -0,23) (6).

El grado de diferenciación genética para FSHR entre estas dos poblaciones fue bajo, pues ambas tienen en común su origen europeo, sumado a que valores entre 0,00 y 0,05 así lo determinan (10), por ende, se puede evidenciar que las frecuencias alélicas para este locus son iguales en ambas razas y que la deriva genética no tuvo efecto sobre las mismas, este valor sumado a los valores de FIT, FIS y heterocigosidad, nos permiten determinar una óptima diversidad genética del locus FSHR en la población estudiada.

Los polimorfismos de FSHR y LHR se han asociado con diferentes parámetros reproductivos. En vacas compuestas de *B. taurus* y *B. indicus*, se evaluó sus efectos sobre la precocidad sexual en las mismas y aunque no existió un efecto estadísticamente significativo se observó que los genotipos heterocigotos para ambos genes así como el doble heterocigoto CT/CG mostraban una mayor tasa de preñez, 76%, 66% y 70%, respectivamente (28) A su vez, en un grupo de vaquillas Holstein que requerían menos de 2 inseminaciones por preñez, se evidenció que únicamente presentaban el genotipo homocigoto CC (155/148 bp) para LHR (4), en esta misma raza se ha estudiado el efecto del SNP A-320T del gen FSHR sobre rasgos reproductivos, observando que aquellos individuos heterocigotos para este polimorfismo de un solo nucleótido, presentaron menor eficiencia



reproductiva con un mayor intervalo por nacimiento (427 días) y servicios por preñez (2,26 s/p) en comparación con los homocigotos (2), un panorama similar se presentó en Holstein Chinas para el SNP G-278A, demostrándose asociación estadísticamente significativa pues aquellos animales con genotipos CC produjeron un mayor número de óvulos y más embriones transferibles que los genotipos heterocigotos CD y homocigotos DD (3).

De esta manera concluyen que los parámetros genéticos como la respuesta ovárica a los protocolos reproductivos, depende considerablemente del fondo genético y que los distintos polimorfismos de estos genes condicionarían las respuestas reproductivas de estos animales, indicando además el potencial de éstos como marcadores para la selección de animales, predictores de respuesta a protocolos reproductivos y en programas de conservación de especies, aprovechando la heterocigosis, demostrando de esta manera la importancia de caracterizar la variabilidad alélica de estos genes, dentro y entre poblaciones (3).



CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

Mediante el ensayo PCR-RFLP para FSHR, se identificó la presencia de tres genotipos: CC, CG y GG, se observó mayor frecuencia de animales homocigotos CC en la totalidad de la población, siendo el ganado Holstein quien presentó mayor porcentaje de estos individuos; sin embargo, existió mayor frecuencia de heterocigotos CG en la raza Criolla. En cuanto a las frecuencias alélicas, el alelo C predominó notablemente tanto en el total de la población como en cada sub población analizada; por otro lado, para LHR, se evidenció la fijación del alelo C en estas razas.

Los valores FIS obtenidos indicaron nula o muy baja consanguinidad en ambas razas, con valores altos de heterocigosis, sin embargo, la raza Criolla, presentó mayor heterocigosis en comparación a la raza Holstein.

Las dos sub poblaciones analizadas no se encuentran muy distantes para el locus FSHR, con una pequeña diferenciación genética entre estas, permitiéndonos concluir que sus frecuencias alélicas son similares.



CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

Comprobar la presencia de alelos nulos para el locus FSHR, en la raza Holstein mediante una nueva amplificación utilizando diferentes primers a los utilizados en la primera PCR.

Correlacionar los polimorfismos observados para FSHR en ambas razas con diferentes parámetros reproductivos y/o a respuestas hacia tratamientos de esta índole.



CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ma L, Sonstegard TS, Cole JB, Vantassell CP, Wiggans GR, Crooker BA, et al. Genome changes due to artificial selection in U.S. Holstein cattle. *BMC Genomics* [Internet]. el 11 de diciembre de 2019 [citado el 7 de noviembre de 2019];20(1):128. Disponible en: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-019-5459-x>
2. Madrid Gaviria S, López Herrera A, Echeverri Zuluaga JJ. Association between FSHR polymorphism with productive and reproductive traits in antioquia holstein cattle. *Rev Fac Nac Agron Medellin* [Internet]. 2016;69(1):7793–801. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/54747>
3. Yang WC, Li SJ, Tang KQ, Hua GH, Zhang CY, Yu JN, et al. Polymorphisms in the 5' upstream region of the FSH receptor gene, and their association with superovulation traits in Chinese Holstein cows. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2010;119(3–4):172–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.02.004>
4. Arslan K, Akyüz B, Akçay A, Ilgar EG, Macun HC, Çınar MU. Association of number of artificial inseminations per pregnancy in holstein dairy cows with polymorphism in luteinizing hormone receptor and follicle stimulating hormone receptor genes. *Slov Vet Res* [Internet]. 2017;54(2):91–8. Disponible en: <https://www.slovetres.si/index.php/SVR/article/view/274/69>
5. Hernández Cruz B. Correlación del Polimorfismo del gen receptor de la hormona folículo estimulante (FSHR) con la respuesta al tratamiento de ovulación múltiple en bovino. [Internet]. Universidad Veracruzana; 2010 [citado el 20 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://cdigital.uv.mx/handle/123456789/9743>
6. Perez E, Sterman J, Viera F, De Carvalho J, Pereira J, Girardi L, et al. Genetic characterization of European-Zebu composite bovine using RFLP markers. *Genet Mol Res* [Internet]. 2005 [citado el 9 de diciembre de 2019];4(3):496–505. Disponible en: www.funpecrp.com.br
7. Arifin DN, Said S, Sumantri C, Putra WP. B, Hadi DN. Luteinizing Hormone Receptor Gene Polymorphism of Pasundan Cattle in Ciamis. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* [Internet]. el 25 de octubre de 2019 [citado el 10 de noviembre de 2019];334:012012. Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/334/1/012012>



8. Omer NN, Gornas N, Rahmatalla SA, Khair M. Genetic Characterization of Indigenous Sudanese Cattle Using FSHR and LHR Genes. Am Sci Res J Eng Technol Sci [Internet]. 2016;24(1):1–9. Disponible en: http://asrjetsjournal.org/index.php/American_Scientific_Journal/article/view/1185
9. Viamonte M, Ramírez A, Vargas J, Benítez D. Caracterización genética e indicadores sanguíneos de la raza bovina criolla Macabea en la Amazonía ecuatoriana. Rev Amaz y Cienc y Tecnol [Internet]. 2018;7(1):1–13. Disponible en: <https://revistas.proeditio.com/REVISTAMAZONICA/article/view/2464>
10. Apolo G, Chalco L. Caracterización fenotípica y genotípica de las poblaciones de bovinos criollos en el Cantón Gonzanamá de la Provincia de Loja. [Internet]. Univerdad Nacional de Loja; 2012 [citado el 20 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/5366>
11. Cevallos O. Caracterización morfométrica y molecular del bovino criollo en la provincia de Manabí (Ecuador) [Internet]. : UCOPress. Universidad de Córdoba; 2017. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10396/14825>
12. Ramón M, Zhunio L. Caracterización morfométrica e índices zoométricos de los grupos raciales bovinos existentes en los cantones occidentales de la provincia del Azuay [Internet]. Universidad de Cuenca; 2017 [citado el 19 de noviembre de 2019]. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/28336>
13. Galvis R, Múnera E, Marín A. Influence of genetic merit for milk production of a holstein herd, on energy balance, metabolic profiles and the postpartum ovarian resumption. Rev Colomb Ciencias Pecu [Internet]. 2007 [citado el 8 de diciembre de 2019];20(4):455–71. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2544477>
14. Vásquez B, Aranguren J. Genética molecular para el mejoramiento de los rasgos reproductivos en bovinos. En: González C, Madrid N, Soto E, editores. Logros y Desafíos de la Ganadería Doble Propósito [Internet]. Maracaibo: Ediciones Astro Data S.A; 2014. p. 192–9. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/266375912_Genetica_molecular_para_el_mejoramiento_de_los_rasgos_reproductivos_en_bovinos



15. FAO. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. [Internet]. Roma; 2010 [citado el 20 de noviembre de 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-a1250s.pdf>
16. Marín P, Cardona D, Cerón M. Genómica en la producción animal. Rev Colomb Cienc Anim - RECIA [Internet]. 2013;5(2):497. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/genetica_seleccion_cruzamientos/bovinos_en_general/29-genetica_genomica.pdf
17. Madrid S, López A, Echeverri J. Genetic structure of Antioquia Holstein from two SNPs and association with dairy traits. Rev MVZ Córdoba [Internet]. 2015;20:4974–88. Disponible en: <https://revistamvz.unicordoba.edu.co/article/view/12>
18. Moncaleano J, Parra R, Peña M, Parra J, Góngora A. Reproductive parameters of some native bovine breeds: Sanmartinero and Casanareño. Anim Genet Resour. 2016;59:97–103.
19. Universidad Autónoma de México. Eficiencia reproductiva de los bovinos en el trópico. Libro Técnico. Estado Del Arte Sobre Investigación Tecnológica En Ganadería Bovina Tropical. México: Redgatro Cona; 2015. 162–193 p.
20. Yang WC, Li SJ, Chen L, Yang LG. FSHR genotype affects estrogen levels but not pregnancy rates in Luxi cattle subjected to embryo transfer. Genet Mol Res [Internet]. 2014 [citado el 7 de noviembre de 2019];13(1):1563–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4238/2014.March.12.8>
21. Klug W, Cummings M, Spencer C. Conceptos de Genética. En: Romo M, editor. Genética de poblaciones [Internet]. 8a ed. Madrid: Prentice Hall; 2006 [citado el 2 de diciembre de 2019]. p. 725–31. Disponible en: www.pearsoneducacion.com
22. Getino L. Estructura poblacional en la medusa bola de cañon (*Stomolophus meleagris*) en el Noroeste de México mediante análisis de microsatélites [Internet]. [Baja California Sur]: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.; 2016 [citado el 15 de enero de 2021]. Disponible en: https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/33/1/getino_l.pdf
23. Parra-Bracamonte GM, Sifuentes Rincón AM, De la Rosa R, Arellano Vera W. Avances y perspectivas de la biotecnología genómica aplicada a la ganadería en México. Trop Subtrop Agroecosystems [Internet]. 2011;14:1025–37. Disponible en: art-S1870-04622011000300005



24. Checa M. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. Rev del Inst Nac Enfermedades Respir [Internet]. 2007;20(3):213–21. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-2007/in073h.pdf>
25. Ríos E, Mejía H, Ticul S. Marcadores moleculares: una revolución en la zoología. [Internet]. Revista Ciencia. México; 2009 [citado el 27 de noviembre de 2019]. Disponible en: https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/60_3/PDF/01-496-Marcadores-moleculares.pdf
26. Ortega J, García L. El genoma bovino, métodos y resultados de su análisis. Rev MVZ Cordoba [Internet]. 2011 [citado el 25 de noviembre de 2019];16(1):2410–24. Disponible en: <https://revistas.unicordoba.edu.co/index.php/revistamvz/article/view/300>
27. National Human Genome Research Institute. Talkinf Glossary of Genetic Terms [Internet]. [citado el 3 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Restriction-Fragment-Length-Polymorphism>
28. Marson EP, Ferraz JBS, Meirelles F V., Balieiro JCC, Eler JP. Effects of polymorphisms of LHR and FSHR genes on sexual precocity in a Bos taurus x Bos indicus beef composite population. Genet Mol Res [Internet]. 2008 [citado el 9 de noviembre de 2019];7(1):243–51. Disponible en: www.funpecrp.com.br
29. Bradley DG, Machugh DE, Cunningham P, Loftus RT. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. el 14 de mayo de 1996 [citado el 14 de enero de 2021];93(10):5131–5. Disponible en: <https://europepmc.org/articles/PMC39419>
30. Esperândio M, Girardi LG, Perez E, Ripamonte P, Vieira Meirelles F, Serman J, et al. Caracterização da heterozigose no gene do receptor do hormônio luteinizante (LHR) en animais da raça Nelore [Internet]. [citado el 14 de enero de 2021]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>
31. Martínez AM, Gama LT, Cañón J, Ginja C, Delgado J V., Dunner S, et al. Genetic Footprints of Iberian Cattle in America 500 Years after the Arrival of Columbus. PLoS One. 2012;7(11):1–13.



32. Nijman IJ, Otsen M, Verkaar ELC, De Ruijter C, Hanekamp E, Ochieng JW, et al. Hybridization of banteng (*Bos javanicus*) and zebu (*Bos indicus*) revealed by mitochondrial DNA, satellite DNA, AFLP and microsatellites. *Heredity (Edinb)* [Internet]. 2003;90(1):10–6. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/6800174>
33. Said S, Putra WPB, Anwar S, Agung PP, Yuhani H. Phenotypic, morphometric characterization and population structure of Pasundan cattle at West Java, Indonesia. *Biodiversitas* [Internet]. 2017;18(4):1638–45. Disponible en: <https://biodiversitas.mipa.uns.ac.id/D/D1804/D180444.pdf>

**CAPÍTULO IX: ANEXOS****Anexo 1.** Conteo de genotipos FSHR - LHR - HOLSTEIN.

PCR-RFLP FSHR - LHR HOLSTEIN		
Muestra Id:	Digestión AluI del Producto de PCR (306 bp)	Digestión HhaI del Producto de PCR (303 bp)
	Genotipos Resultantes	Genotipos Resultantes
H046-12	CC	CC
H048-14	CC	CC
H045-11	CC	CC
H053-453.2	CC	CC
H019-523	CC	CC
H028-651	CC	CC
H001-112	CC	CC
H002-125	GG	CC
H004-131	CC	CC
H005-135	CG	CC
H054-502	CG	CC
H051-432	CC	CC
H006-166	CC	CC
H033-2	CG	CC
H008-62	CC	CC
H018-520	CC	CC
H063-617	CC	CC
H026-647	CC	CC
H062-582	CG	CC
H024-634	CC	CC
H040-6	CG	CC
H029-653	CC	CC
H061-578	CG	CC
H007-59	CC	CC
H064-682	CG	CC
H055-539	CC	CC
H066-1280	CG	CC
H057-544	CC	CC
H060-571	CG	CC
H059-568	CC	CC

**Anexo 2.** Conteo de genotipos FSHR - LHR - CRIOLLOS.

PCR-RFLP FSHR - LHR CRIOLLOS			
Lugar de procedencia (LOTE) Id:	Muestra Id:	Digestión AluI del Producto de PCR (306 bp)	Digestión HhaI del Producto de PCR (303 bp)
		Genotipos Resultantes	Genotipos Resultantes
9	1	CC	CC
	3	CC	CC
	5	CG	CC
3	2	CC	CC
6	3	CC	CC
	5	CC	CC
37	3	CG	CC
	6	CC	CC
	9	CG	CC
	11	CC	Sin genotipo
	14	CG	CC
	17	CG	CC
	20	CG	CC
	21	CG	CC
	22	CG	CC
	23	CC	CC
	25	CG	CC
	28	CG	CC
	29	CC	CC
	31	CG	CC
	32	CG	CC
	34	CG	CC
	36	CG	CC
37	CG	CC	
17	5,5	NO DIGERIDO SIN GENOTIPO	CC
	7,5	CC	CC
	10,5	CC	CC
	13,5	CG	CC
	14,5	CC	CC
	16,5	CC	CC