

PUBLICADO EN LA XXIV REUNION INTERNACIONAL DE CARNE Y LECHE EN CLIMAS CÁLIDOS.
MAZATLAN SINALOA MÉXICO. NOVIEMBRE DE 2014.

IDENTIFICACIÓN DE UN POLIMORFISMO DEL GEN PAPP-A2 RELACIONADO CON MEJOR DESEMPEÑO REPRODUCTIVO EN VACAS HOLSTEIN CRIADAS AL SUR DE SONORA MEXICO

IDENTIFICATION OF A POLYMORPHISM OF THE PAPP-A2 GENE RELATED WITH HIGHER REPRODUCTIVE PERFORMANCE IN HOLSTEIN COWS RAISED AT THE SOUTH OF SONORA MEXICO

Leyva CJC¹, Siqueiros MM¹, Estrada MEN¹, Milton TG², Rincon G³, Medrano JF³, Avendaño RL⁴, Correa CA⁴ y Luna NP¹

¹ Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias del Instituto Tecnológico de Sonora. Calle 5 de Febrero 818 Sur, Col. Centro, Cd. Obregón, Sonora, México. C.P. 85000 jose.leyva@itson.mx

² Department of Animal Science, Colorado State University, CO. EUA

³ Department of Animal Science, University of California, Davis CA. EUA

⁴ Instituto de Ciencias Agrícolas, UABC. Ejido Nuevo León. México.

RESUMEN

La expresión del gene PAPP-A2 puede asociarse a rasgos relacionados con la fertilidad del bovino. El objetivo del estudio fue identificar un polimorfismo del gen del PAPP-A2 asociado con mayor eficiencia reproductiva en ganado Holstein criado al sur de Sonora. De la población animal (n=261) se obtuvo ADN que fue utilizado para la genotipificación de cinco polimorfismos del gen PAPP-A2 mediante espectrometría de masas. Un modelo mixto asoció estadísticamente los genotipos del PAPP-A2 con *Días Abiertos* (DA), *Intervalo entre Partos* (IP) y *Servicios por Concepción* (SC). El genotipo TT del PAPP-A2-4 fue el más favorable (P<0.05) para DA (119.96 d), IP (401.96 d) y SPC (1.63 serv/concep). El alelo T indicó -28.15 d menos en DA e IP, así como -0.10 servicios por concepción (P<0.05), concluyendo que el PAPP-A2-4 puede ser un gen predictor para el desempeño reproductivo en la población de ganado Holstein del sur de Sonora.

Palabras clave: Fertilidad, PAPP-A2, polimorfismo.

INTRODUCCIÓN

La eficiencia reproductiva del bovino es sensible a las condiciones climáticas, especialmente durante los meses cálidos (Correa *et al.*, 2009). El mapeo del genoma bovino ha representado un salto enorme en el entendimiento de algunas regiones cromosómicas relacionadas a funciones de importancia económica como la fertilidad de la vaca (Luna *et al.*, 2010). El gen de la Proteína Plasmática Asociada a la Preñez A2 (PAPP-A2), ubicado en el cromosoma 16 del bovino es uno de los candidatos implicados (Fortes *et al.*, 2013) y ha sido asociado al comportamiento reproductivo del bovino, asumiendo relación funcional en el eje endocrino GH-IGF (Luna *et al.*, 2012). El valle del Yaqui se encuentra al sur de Sonora México, zona cálida que afecta el desempeño fisiológico de la vaca Holstein (Leyva *et al.*, 2008), donde es común observar vacas con un desempeño reproductivo satisfactoria respecto al resto de la población, por lo que es posible que exista un polimorfismo o variante del gen PAPP-A2 dentro de esta población que se asocie a un mejor comportamiento

reproductivo bajo las condiciones climáticas del sur de Sonora. El objetivo del estudio fue identificar un polimorfismo del gen del PAPP-A2 asociado a mayor eficiencia reproductiva del ganado Holstein criado al sur de Sonora México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionó una población de 261 vacas Holstein de un establo comercial ubicado en el Block 1114 del Valle del Yaqui, Sonora. Se extrajo una muestra sanguínea mediante punción de la vena coccígea para depositar 4-5 gotas de sangre distribuidas en tarjetas *Blood-Cards™*, las cuales se enviaron al Lab. Neogen/GenSeek Inc., USA, para la extracción (Gentra Puregene DNA Isolation Kit, Gentra, Minneapolis, MN, 55441) y cuantificación de ADN, así como la posterior genotipificación de cinco variantes polimórficas correspondientes a los genes del PAPP2 (*PAPPA2-1*, *PAPPA2-2*, *PAPPA2-3*, *PAPPA2-4* y *PAPPA2-5*) en esta población de vacas Holstein que son expuestas a temperaturas que superan los 35°C durante cinco meses del año. Varios ensayos en PCR se ejecutaron para la genotipificación; la técnica de espectrometría de masas (MALDITOF) fue utilizada para identificar la secuencia primaria y los alelos localizados en el sitio polimórfico. En la última fase de la plataforma comercial "Sequenom Mass Array" se transcribe (SpectroTYPER) la masa del iniciador específico en el genotipo correspondiente para cada reacción (Luna *et al.*, 2012).

Las variables analizadas fueron: *Días abiertos (DA)*, *Intervalo entre partos (IP)* y *Servicios por concepción (SPC)*, colectadas (años 2012 y 2013) y organizadas en el programa Excel. La estadística descriptiva para las medias DA, IP y SPC, fueron calculadas con el procedimiento MEANS en el paquete estadístico SAS (SAS, 2004); el procedimiento ALLELE estimó la frecuencia alélica y de genotipos y el No Equilibrio de *Hardy-Weinberg (HW)*, mientras que el procedimiento MIXED ejecuto la asociación del valor fenotípico (DA, IP y SC) con el efecto fijo del genotipo de cada polimorfismo. La opción PDIFF del procedimiento LSMEANS fue ejecutado para la comparación de medias incluyendo el ajuste Bonferroni. Como criterio de inclusión de polimorfismos al estudio asociativo, solo se incluyeron aquellos con una frecuencia mayor al 10% en su alelo menor (FAM>10%). El efecto individual del alelo sobre el fenotipo dentro de la población, fue estimado mediante substitución alélica en un modelo de regresión, incluyendo el genotipo como covariable (Falconer y MacKay, 1996). Los efectos de dominancia y aditividad fueron estimados de acuerdo a los procedimientos descritos por Sherman *et al.* (2008), utilizando un análisis de contrastes (lineales y cuadráticos) para confirmar si el efecto individual de los alelos de cada gen fue aditivo o dominante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestran las medias generales para los caracteres DA, IP, SPC y % de preñez al primer servicio en la población de estudio. La tabla 2 presenta la frecuencia (%) de alelos y genotipos para el gen PAPP-A2 incluidos de acuerdo a la condición FAM>10% y asumiendo que no están en equilibrio HW ($P>0.05$). Una frecuencia entre el 5 al 10% del alelo menor es requerida para evitar falso resultados (Balding, 2006). De los cinco polimorfismos, el PAPP2-4 resultó significativo para DA ($P= 0.0114$), IP, ($P= 0.0114$) y SPC ($P= 0.0082$) (Tabla 3). En vacas con genotipo TT (119.96 d) resultaron con menor número de días en DA ($P<0.05$) respecto a AA (-31.44 d) y TA (-40.19 d). Un desempeño más favorable para el IP ($P<0.05$) se observó en TT (401.96) respecto a AA (433.64 d) y TA (442.15 d),

mientras que menor número de SPC fue requerido ($P < 0.05$) para vacas TT (1.2779 serv/concep) y AA (1.6370 serv/concep). El análisis de sustitución alélica (Tabla 4), mostró que el gen *PAPPA2-4* resultó ser un buen predictor para DA, IP y SPC, donde el alelo favorable indicó una reducción de -28.152 d para DA e IP ($P = 0.0014$), mientras que los SPC se redujeron -0.1010 ($P = 0.0082$) ante la presencia del alelo. El gen *PAPP-A2* se ubica en el cromosoma 16 en el *Bos Taurus* y otros estudios han asociado aspectos de fertilidad al participar dentro del eje funcional GH-IGF1 (Luna et al., 2010).

De acuerdo con los polimorfismos analizados para el gen de la *PAPP-A2*, solo el *PAPPA2-4* se asoció estadísticamente con DA, IP y SPC, lo cual es coincidente con los resultados de Wickramasinghe et al., (2011), quienes explican en su trabajo que este polimorfismo influye sobre la tendencia genética para caracteres relacionados con la reproducción. Luna et al (2012) reportaron una asociación entre un polimorfismo del *PAPP-A2* (rs110490898) con una menor edad al primer (-37.1 d) y segundo parto (-65.43 d) en una población de ganado Romosinuano. Otro trabajo similar en vaquillas Angus, Brahaman y Romosinuano de primer parto, se reportaron dos marcadores del *PAPP-A2*, los cuales fueron asociados al comportamiento reproductivo (intervalo entre parto, días al parto y tasa de preñez), aunque a diferencia del presente estudio, esos marcadores no fueron predictores de fertilidad (Luna et al., 2010).

Se concluye que dentro de la población de estudio, la presencia de una variante del *PAPP-A2* resultó ser un buen predictor para *días abiertos*, *intervalo entre partos* y *servicios por concepción*, lo que lo convierte en parte del complejo de genes candidatos implicados en la expresión de un comportamiento reproductivo superior en algunas vacas Holstein que son expuestas a condiciones cálidas gran parte del año en la zona del sur de Sonora.

Tabla 1. Medias para los caracteres relacionados con la eficiencia reproductiva de la población de ganado Holstein criado en el valle del Yaqui del presente estudio.

Fenotipo	n	Media \pm EE
<i>Días Abiertos (DA)</i>	253	140.9 \pm 5.8
<i>Intervalo entre partos (IP)</i>	253	422.9 \pm 5.8
<i>Servicios por Concepción (SPC)</i>	253	1.86 \pm 0.07
<i>% Preñez al primer servicio</i>	198	61.1 \pm 2.4

PROC UNIVARIATE en SAS. Se eliminaron animales debido al cumplimiento de la prueba de Hardy Weinberg y número de polimorfismos que pudieron secuenciarse por la calidad de la muestra de ADN.

Tabla 2. Frecuencia alélica y genotípica de los 5 polimorfismos del gen PAPP-A2 encontrados en la población de ganado Holstein del valle del Yaqui, Sonora México.

Gen	Polimorfismo	Frecuencia de alelos (%)		Frecuencia de Genotipos (%)		
		A	G	AA	AG	GG
PAPP-A2	<i>PAPPA2-1</i>	37.505	62.505	5.56	63.89	30.56
	<i>PAPPA2-2</i>	36.105	63.885	11.90	48.41	39.68
	<i>PAPPA2-3</i>	28.14	71.86	7.29	41.70	51.01
	<i>PAPPA2-4</i>	44.40	55.60	0.40	88.00	11.60
	<i>PAPPA2-5</i>	38.29	61.71	5.95	64.68	29.37

Polimorfismos del gen PAPP-A2 considerados por criterio inclusión por FAM>10% y el supuesto de no equilibrio ($P>0.05$) para la prueba de *Hardy-Weinberg*.

Tabla 3. Medias de cuadrados mínimos para los caracteres de fertilidad por efecto asociados al genotipo del polimorfismo marcador del gen PAPP-A2 encontrado en la población de ganado Holstein del valle del Yaqui.

Fenotipo	Genotipos para <i>PAPPA2-4</i>			Prob
	AA (n=17)	TA (n=135)	TT (n=302)	
DA	151.64 ± 27.3724 ^a	160.15 ± 11.6045 ^a	119.96 ± 7.8330 ^b	0.0144
IP	433.64 ± 27.3724 ^a	442.15 ± 11.6045 ^a	401.96 ± 7.8330 ^b	0.0144
SPC	2.2779 ± 0.2719 ^a	2.0091 ± 0.1150 ^a	1.6370 ± 0.07742 ^b	0.0082

^{a,b} Indican diferencia estadística ($P<0.05$) entre medias de genotipo.

Tabla 4. Análisis de sustitución alélica para el genotipo favorable a fertilidad del polimorfismo del gen PAPP-A2 encontrado en la población de ganado Holstein criado en el valle del Yaqui.

Caracter	Efectos de sustitución alélica	
	Valor estimado ± EE	Prob
Días abiertos	-28.152 ± 10.6833	0.0014
Intervalo entre partos	-28.152 ± 10.6833	0.0014
Servicios por concepción	-0.1010 ± 0.1082	0.0082

Valores generados considerando al genotipo como covariable dentro de un modelo de regresión.

LITERATURA CITADA

Balding, DJ. 2006. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat. Rev. Genet.* 7: 781-791.

Correa, C.A., C. Leyva, L. Avendaño, F. Rivera, R. Díaz, F.D. Álvarez, F. Ardon y F. Rodríguez. 2009. Effect of artificial cooling and its combination with timed artificial insemination on fertility of Holstein heifers during summer. *J. Appl. Anim. Res.* 35:59-62.

Fortes MRS., DeAtley KL, Lehnert SA, Burns BM, Reverter A, Hawken RJ, Boe-Hansen G, Moore SR, Thomas MG. 2013. Genomic regions associated with fertility traits in male and female cattle: Advances from microsatellites to high-density chips and beyond. *Animal Reproduction Science.* 141:1-19.

Falconer, D.S. y Mackay, T.F. 1996. Loci de caracteres cuantitativos. p.363-384. En: Falconer, D.S. y Mackay, T.F.C. *Genética cuantitativa.* Cuarta edición. ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España.

Leyva J.C.C., Félix P.V., Luna N.P., Morales M.I.P. y Grageda J.G. 2008. Impacto de las condiciones climáticas de verano en el valle del Yaqui sobre el desempeño productivo del ganado lechero. XVIII Reunión Internacional sobre Producción de Carne y Leche en Climas Cálidos. Mexicali BC, México. Pp. 233-237.

Luna, N.P, Rincón G., Medrano J.F, Riley, DG, Chase CC, Coleman SW, DeAtleye KL, Islas AT, Silver GA, Thomas MG. 2012. Identification of one polymorphism from the PAPP-A2 gene associated to fertility in Romosinuano beef heifers raised under a subtropical environment. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 3(2):185-200.

Luna NP., G. Rincon, J. F. Medrano, D. G. Riley, C. C. Chase, Jr., S.W. Coleman, D.M. VanLeeuwen, K. L. DeAtley, A. Islas-Trejo, G. A. Silver, and M. G. Thomas. 2010. Single nucleotide polymorphisms in the growth hormone – insulin like growth factor axis in straightbred and crossbred Angus, Brahman, and Romosinuano heifers: population genetic analyses and association of genotypes with reproductive phenotypes. *J. Anim. Sci.* 89: 926-934.

SAS. SAS/STAT User´s Guide, Software Version 9.1.2 Cary, NC: SAS Institute Inc., 2004. USA.

Sherman, E. L., J. D. Nkrumah, B. M. Murdoch, C. Li, Z. Wang, A. Fu, and S. S. Moore. 2008. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuro peptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 86:11-16.

Wickramasinghe, S., G Rincon, JF Medrano. 2011. Variants in the pregnancy-associated plasma protein-A2 gene on *Bos taurus* autosome 16 are associated with daughter calving ease and productive life in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science.* Volume 94, Issue 3, Pages 1552–1558.