

Artículo de investigación

Differences in polymorphisms of genes associated with follicle development control between buffaloes (*Bubalus bubalis*) and cattle (*Bos indicus*)*Diferencias en los polimorfismos de genes asociados al control del desarrollo folicular entre búfalos (*Bubalus bubalis*) y vacunos (*Bos indicus*)**Diferenças nos polimorfismos genéticos associados ao controle do desenvolvimento folicular entre búfalos (*Bubalus bubalis*) e bovinos (*Bos indicus*)*

Jesús Alfredo Berdugo-Gutiérrez ^{1*} ✉, DMV, MSc, PhD(c), [CvLAC](#); Ariel Marcel Tarazona-Morales ², Zoot, MSc, PhD, [CvLAC](#); José Julián Echeverry ¹, Zoot, MSc, PhD, [CvLAC](#); José Luis Buitrago Castaño ¹, Est, Ing, Quim.; Albeiro López Herrera ¹, MV, Zoot, MSc, PhD, [CvLAC](#)

Fecha correspondencia:

Recibido: 15 de noviembre de 2019.

Aceptado: 10 de diciembre de 2019.

Forma de citar:

Berdugo-Gutiérrez JA, Tarazona-Morales AM, Echeverry JJ, Buitrago Castaño JL, López Herrera A. Diferencias en los polimorfismos de genes asociados al control del desarrollo folicular entre búfalos (*Bubalus bubalis*) y vacunos (*Bos indicus*). Rev. CES Med. Zootec. 2019; Vol 14(3): 53-63.

[Open access](#)[© Copyright](#)[Creative commons](#)[Ethics of publications](#)[Peer review](#)[Open Journal System](#)DOI: [http://dx.doi.org/10.21615/](http://dx.doi.org/10.21615/cesmvz.14.3.5)[cesmvz.14.3.5](#)

ISSN 1900-9607

Comparte

**Abstract**

Associations have been found between genetic polymorphisms and reproductive parameters, this approach additionally would allow us to propose explanations to the phenomena studied. FSHr, InhA, AMH and AMHr are genes associated with follicular development, which have a high homology and the same function in bovines. The objective of this work was to evaluate if some polymorphisms described in other species associated with reproductive parameters are found in two closely related bovines. During 2018, in the Colombian Magdalena Medio anticoagulated blood samples from 50 buffaloes (*Bubalus bubalis*) and 50 commercial zebu cows (*Bos indicus*) were taken. All animals without anatomical abnormalities and similar weight and age were taken and the parity, intercalving period and age at first calving were also recorded. DNA were extracted using *Salting out* method and the reported polymorphisms of the above mentioned genes were evaluated. Data were compared using Mann Whitney test and $p < 0.05$ value were considered significant. Buffaloes have lower AMH levels, age at first calving, calving interval than *Bos indicus* cows ($p < 0.001$) and higher parity ($p = 0.005$). The polymorphisms reported in Holstein and humans were not confirmed in any of the samples and species analyzed. The results, are in some way paradoxical because there are differences in reproductive parameters but nothing different in the studies genes. It shows the need to rethink the approach of the study of the association of reproductive and genetic phenomena

Key words: AMH, AMHr, Buffaloes, FSHr, InhA, Polymorphisms.

Resumen

Se han encontrado asociaciones entre polimorfismos genéticos y parámetros reproductivos, este abordaje adicionalmente permitiría proponer explicaciones

Filiación:

*Autor para correspondencia: Jesús A. Berdugo. Correo electrónico: jaberdugog@unal.edu.co

1. Grupo de Investigación Biogem. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín;

2. Biogénesis. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Carrera 65 No 59^a 110. BL 50 of 231. Medellín. Colombia.

a diferentes fenómenos estudiados. FSHr, InhA, AMH y AMHr son genes asociados al desarrollo folicular, que tienen una alta homología y la misma función en bovinos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar en bovinos muy relacionados si se encuentran algunos polimorfismos asociados a parámetros reproductivos reportados en otras especies. Durante el 2018, en el Magdalena Medio Colombiano fueron tomadas muestras de sangre anticoagulada de 50 búfalas mestizas (*Bubalus bubalis*) y 50 vacas cebú comercial (*Bos indicus*). Se registró la paridad, días abiertos, intervalo parto primer servicio y edad al primer parto de cada animal, sin alteraciones anatómicas, con edad y peso similar, mantenidos en las mismas condiciones de alimentación y manejo. Se extrajo el ADN por el método de *Salting out* y se evaluaron los polimorfismos de acuerdo con lo reportado en la literatura. Se compararon los datos usando la prueba Mann Whitney, se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Se encontró que los búfalos tienen menores niveles de AMH, edad al primer parto, intervalo entre partos que las vacas ($p < 0,001$), mayor paridad ($p = 0,005$). No se confirmaron los polimorfismos reportados en Holstein y en humanos en ninguna de las muestras y especies analizadas. No confirmar los hallazgos en bovinos de otras razas y especies, aunque las especies tengan diferentes parámetros reproductivos, muestra la necesidad de replantear el abordaje del estudio de la asociación de los fenómenos reproductivos y genéticos.

Palabras clave: AMH, AMHr, Búfalos, FSHr, InhA, Polimorfismos.

Resumo

Foram encontradas associações entre polimorfismos genéticos e parâmetros reprodutivos; essa abordagem também permitiria propor explicações para os diferentes fenômenos estudados. FSHr, InhA, AMH e AMHr são genes associados ao desenvolvimento folicular, que apresentam alta homologia e a mesma função em bovinos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar em bovinos intimamente relacionados se alguns polimorfismos associados a parâmetros reprodutivos relatados em outras espécies. Em 2018, 50 vacas de búfalo (*Bubalus bubalis*) e 50 de zebu comerciais (*Bos indicus*) foram amostradas na Magdalena Medio colombiana. Foram registradas paridade, dias abertos, intervalo de nascimento do primeiro serviço e idade no primeiro nascimento de cada animal, sem alterações anatômicas, com idade e peso semelhantes, mantidas nas mesmas condições de alimentação e manuseio. O DNA foi extraído pelo método *Salting out* e os polimorfismos foram avaliados de acordo com o relatado na literatura. Os dados foram comparados pelo teste de Mann Whitney, sendo considerado significativo um valor de $p < 0,05$. Verificou-se que os búfalos apresentam níveis mais baixos de AMH, idade do primeiro nascimento, intervalo entre os nascimentos que as vacas ($p < 0,001$), maior paridade ($p = 0,005$). Os polimorfismos relatados em Holstein e em humanos não foram confirmados em nenhuma das amostras e espécies analisadas. A não confirmação dos achados em bovinos de outras raças e espécies, embora as espécies possuam diferentes parâmetros reprodutivos, mostra a necessidade de repensar a abordagem do estudo da associação dos fenômenos reprodutivos e genéticos.

Palavras-chave: AMH, AMHr, buffalo, FSHr, InhA, polimorfismos.

Introducción

Los recientes avances en biología molecular y bioestadística¹² han facilitado que se estudie la variación genómica y su posible asociación con parámetros productivos y reproductivos de interés en ganadería y reproducción humana.

Una de las posibilidades es el estudio de los polimorfismos, que se han definido como una variante en la secuencia de ADN que tiene una frecuencia mayor al 1% de la población⁹. El estudio de los polimorfismos de los genes que regulan la función reproductiva permitirían clarificar los mecanismos de la función gonadal y la fertilidad en las especies de interés³, en el humano se propuso que si bien es cierto exista la posibilidad que el polimorfismo per se no afecte la proteína si se ha asociado a ciertos fenotipos, para el caso infertilidad¹.

Se propone que, más allá de la identificación del polimorfismo y sus asociaciones, el estudio combinado del genoma de los individuos junto con los fenotipos pudiera generar información sobre la naturaleza de los eventos que se estudian y desde la biología reproductiva comprender los fenómenos observados para proponer estrategias que mejoren los resultados cuando se aplican los conceptos desarrollados en las diferentes técnicas en los sistemas de producción.

En el caso eventos reproductivos, estudios previos en el laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Sede Medellín, han demostrado asociación entre los parámetros reproductivos y productivos de los genes receptor de la hormona folículo estimulante (FSHr), factor de crecimiento insulinoide (IGF1); inhibina A (InhA)⁴. En humanos se ha informado que existe asociación entre un polimorfismo de la hormona antimulleriana (AMH) y su receptor tipo II (AMHRII)⁵. Un polimorfismo génico es una variante en la secuencia de ADN que tiene una frecuencia mayor al 1% de la población⁹. El estudio de los polimorfismos de los genes que regulan la función reproductiva permitirían clarificar los mecanismos de la función gonadal y la fertilidad en las especies de interés³, en el humano se propuso que si bien es cierto exista la posibilidad que el polimorfismo per se no afecte la proteína si se ha asociado a ciertos fenotipos, para el caso infertilidad¹.

El potencial reproductivo de una hembra es el resultado del delicado balance entre la cantidad de folículos primordiales producidos en la vida fetal que son almacenados hasta la pubertad y su utilización después de la pubertad. Los folículos son reclutados durante cada onda y finalmente son ovulados, este balance es lo que le permite a cada hembra cumplir su función reproductiva⁶ La mayoría de los folículos formados se atresian antes de la pubertad⁷ y cada folículo inicia su crecimiento gracias a que adquiere receptores para la FSH y así poder continuar hacia la ovulación⁸. Todo el conocimiento asociado a estos fenómenos ha sido obtenido de modelos animales, principalmente individuos genéticamente modificados, monos Rhesus y especies de granja^{8,9,10}.

Mantener ese balance entre la cantidad de folículos que se atresian y los que son utilizados para una ovulación es el resultado de la interacción de diversos factores controladores de la reserva ovárica y los efectores del desarrollo folicular como: el factor transformante b, la hormona antimulleriana (AMH) y las gonadotropinas (hormona folículo estimulante y su receptor, FSH,FSHr, hormona-LH y la inhibina). El control de la reserva ovárica depende principalmente de la interacción entre la FSH y su receptor y moléculas autocrinas pertenecientes a la familia del factor transformante beta¹¹. Para la ovulación, el control del paso de folículo primordial a folículo primario depende de la relación estrecha entre AMH, FSH y algunos factores de crecimiento, cuya función dado que son proteínas extracelulares depende de la expresión de receptores en las células de granulosa¹⁰.

La AMH ejerce su función biológica mediante su unión al receptor tipo II de la hormona (AMHRII), que a su vez activa el receptor tipo I (AMHRI) desencadenando la vía de señalización de las proteínas SMAD, en el humano, en el humano el AMH está localizado en el cromosoma 19 y el gen AMHRII está en el 12, posee 11 exones y se expresa exclusivamente en las células de granulosa y de la teca¹², en los vacunos están localizados en el cromosoma 7 y 5, respectivamente, sin que hayan sido informados polimorfismos en esta especie. En humanos se han informado dos polimorfismos en el gen de la AMH y dos en el AMHRII¹³ que se han podido correlacionar con el estado reproductivo de mujeres adicionalmente también se ha asociado con los niveles de estradiol, al principio de la fase folicular durante el ciclo menstrual, mostrando el papel de la AMH en la regulación de sensibilidad a la FSH⁵.

La FSH es una glicoproteína que no puede pasar la membrana celular, lo que hace que toda su función se realice a través de su receptor (FSHR). FSH r está localizado en el cromosoma 11 de los vacunos, (FSHR), pertenece a la familia de las proteínas G, expresada por las células de la granulosa de la que se ha informado que mutaciones del mismo han sido asociadas con alteraciones en la reproducción.¹⁴ Yang y colaboradores han informado la asociación de un polimorfismo en el promotor del gen del receptor con la respuesta a la superovulación en vacas Holstein¹⁵.

La inhibina es una proteína dimérica compuesta por una subunidad A y dos subunidades B, ambas producidas en las células de la granulosa de los folículos, el gen está localizado en el cromosoma 2 de los bovinos. Esta proteína juega un importante rol en la supresión de la secreción de hormona folículo estimulante, y la concentración de ambas proteínas en sangre tiene una relación directamente inversa, por lo que afectan directamente el crecimiento folicular¹⁶. La subunidad alfa de la inhibina ha sido asociada principalmente con características reproductivas, encontrándose asociación entre polimorfismo del gen y la tasa de superovulación en vacas Holstein, por lo que se ha postulado como un gen candidato para mejorar el desempeño reproductiva¹⁷.

Dada la gran homología existente entre las secuencias de cada uno de los genes mencionados entre especies de bovinos, que los genes tengan la misma función, la poca información existente en la especie bufalina, y la posibilidad que una forma nueva de explicar los fenómenos observados sea la comparación entre especies, el objetivo del presente trabajo fue evaluar si en la especie bufalina y en vacunos indicus se encuentran los mismos polimorfismos asociados a parámetros reproductivos descritos en vacunos Holstein y humanos en genes importantes para el desarrollo folicular que han sido reportados por otros autores.

Materiales y métodos

Localización

Las muestras para este trabajo fueron obtenidas en dos explotaciones ganaderas del Magdalena Medio Colombiano, 6°18'48''N 73°57'00''O, en una zona clasificada como bosque húmedo tropical, a 120 MSNM, con una temperatura promedio de 24°C, humedad de 79% y una precipitación anual de 2766 mm³. Durante el año 2018, se tomaron muestras de sangre con anticoagulante EDTA (EDTA, Vacutainer, Beckton Dickinson). de 50 búfalos (*Bubalus bubalis*) mestizos y 50 vacas (*Bos indicus*) cebú comercial, sin alteraciones evidentes en su anatomía externa y en sus genitales internos, Cada especie con un peso y edad promedio similar 538 kg. vs 427 kg y 7,34 años vs 7,16 años para búfalos y vacas, respectivamente. Se registró la información sobre de paridad, días abiertos, intervalo parto primer servicio y edad al primer

parto. Los animales fueron mantenidos en las mismas condiciones de alimentación y manejo, pastoreaban (*Brachiaria humidicola*) y consumían una mezcla mineral a voluntad, además de tener un manejo extensivo.

Al momento de la selección de los animales, la muestra tomada fue dividida en dos partes, una destinada para la determinación de los niveles de AMH, y la otra para la obtención de plasma que fue obtenido después de la centrifugación y congelado a -20°C hasta el momento de la determinación de AMH mediante el uso de un kit comercial AMH ELISA. (Cat No AL-114 Lot No 010616-B Ansh Labs, Webster, TX, USA.).

Extracción de ADN e Identificación de los polimorfismos

Para la obtención de ADN genómico se utilizó la técnica de *Salting out* modificada y descrita previamente¹⁸.

Identificación de los polimorfismos

En la tabla 1, se muestra la información sobre los *primers*, la especie y la metodología usada para la identificación de los segmentos a evaluar, las condiciones de cada amplificación se encuentran en las referencias citadas para cada caso. Para la identificación de los polimorfismos de los genes FSHr e InhA se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa más los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (PCFR-RFLP), para los genes AMH y AMHr se utilizó la técnica de alta resolución de fusión (HRM, del inglés *high melting resolution*).

Tabla 1. Cebadores utilizados, tamaño del fragmento y referencia utilizada.

Gen	Especie	Técnica	Cebador	Fragmento	Enzima	Ref.
FSHr	Bovina	PCR-RFLP	F:5'AGTTTCGACCGCATCCCTG-3' R:5'AATTCATTTGTGCCAGCATC-3'	970 pb	TaqI	18
Inh A	Bovina	PCR_RFLP	F:5'GCCCTGTTTCTGGATGCC-3' R:5'ATTCAACCCAACCTGCCTA-3'	249 pb	MspI	15
AMH	Humana	HRM	F-5' ACCAGTGGCCTCATCTTCC-3' ' R-5 AGGAAGGCCTGCATAGG-3'	152 pb	N/A	10
AMHr	Humano	HRM	F-5' GGTAACCTCTAATATGGGCTGTG-3, R-5' TCTCAGGAGGAAACCAATGTG-3	150 pb	N/A	10

Dada la escasa información existente para los búfalos y los vacunos indicus se decidió utilizar como controles positivos el mismo tipo de muestras usadas en los artículos de referencia, en el caso de los genes FSHr e Inhibina, vacunos de la raza Holstein, a los que previamente se les había realizado la genotipificación en el laboratorio, y para los genes AMH y AMHrII muestras de humano.

Se realizó adicionalmente una búsqueda en los bases de datos de National Institute of Health en las bases de datos Gene, Genome and Protein, y se utilizó BLAST para la comparación de las secuencias de ADN, RNA y proteína de los genes estudiados. Fueron usados como genomas de referencia para vacas *Bos taurus* (assembly ARS-UCD1.2), para humano : *Homo sapiens* (assembly GRCh38.p13), vacas indicus: *Bos indicus* (assembly Bos_indicus_1.0) y para búfalos *Bubalus bubalis* (assembly UOA_WB_1).

La información sobre los parámetros reproductivos es presentada como la media \pm la desviación estándar, fueron comparados por especie. Se estimaron las diferencias

estadísticas fueron usando la prueba Mann Whitney utilizando el software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), se consideraron diferencias significativas valores de $p < 0,05$.

Aval del comité de ética

El Comité Institucional para el Uso y Cuidado de los Animales en Investigación de la Sede Medellín, constituido mediante el Acuerdo 010 de 2016 del Consejo de Sede (CS), tomó en consideración el componente ético involucrado en la propuesta de investigación "Identificación de polimorfismos en genes asociados a la reserva ovárica y proteómica de oocitos en vacunos y búfalos". Al respecto, el Comité ha decidido otorgar el aval ético para desarrollar el proyecto, mediante el oficio CICUA-013 de octubre 2017.

Resultados

Los parámetros reproductivos de las dos especies evaluadas en este estudio se muestran en la tabla 2. Los búfalos tienen menores niveles de AMH, edad al primer parto, intervalo entre partos que las vacas ($p < 0,001$), mayor paridad ($p = 0,005$). A pesar de seleccionar los animales al azar, se observan diferencias significativas en los días postparto al momento de la toma de muestra y la paridad ($p = 0,005$).

Tabla 2. Media de los de valores de parámetros reproductivos en la muestra estudiada.

	AMH (pg/mL)	Paridad	Edad al primer parto	Días interparto
Bos	1305,44	2,16	41,64	532,53
SDE	677,1	1,62	6,12	151,06
MAX	2226	6	59,7	1012
MIN	184	0	32,4	373
Bubalus	354,32	4,24	35,75	430,65
SDE	328,43	3,4	5,28	44,28
MAX	1856	12	48	569
MIN	78	1	26,6	346
Valor de P	<0,0001	0,0005	<0,0001	0,0005

En la tabla 3 se muestran los resultados de la búsqueda en la literatura y las bases de datos, se pudo confirmar, la alta homología existente entre la secuencia de los genes evaluados, los RNAs y las proteínas.

En ninguna de las muestras de búfalos y de vacunos del estudio se pudo demostrar el polimorfismo descrito, debido a que no se obtuvieron amplificadas con los *primers* descritos para los genes FSHr, InhA, AMH y AMHr., es importante mencionar que si se pudieron confirmar los polimorfismos en las muestras control.

Para los genes de AMH y AMHr, con la técnica de HRM, se pudo amplificar un fragmento de 143 pb y de 150 pb, respectivamente en todas las muestras humanas evaluadas, no se lograron amplificaciones en los vacunos ni en los búfalos. Cuando se evaluó la amplificación del gen AMHr utilizando *primers* vacunos, se lograron amplificaciones solamente en los vacunos no hubo amplificación en los búfalos, ni en los humanos, en los vacunos se encontró un fragmento entre 271 y 278.

Tabla 3. Comparación de la homología de secuencia de los genes, RNAm y proteínas de los genes AMH, AMHr, FSHr, InhA. Se muestra la comparación del número de aminoácidos de la proteína.

Nombre	Secuencia	Especie	<i>Bos indicus</i>	<i>Bubalus bubalis</i>
AMH	Gen	Humano	79%	76%
AMHr	Gen	Humano	79%	76%
FSHr	Gen	<i>Bos taurus</i>	99%	97%
InhA	Gen	<i>Bos taurus</i>	99%	97%
AMH	RNAm	Humano	68%	77%
AMHr	RNAm	Humano	no disponible	no disponible
FSHr	RNAm	<i>Bos taurus</i>	no disponible	98%
InhA	RNAm	<i>Bos taurus</i>	99%	97%
AMH	Proteína	Humano	47%	58%
AMHr	Proteína	Humano	60%	no disponible
FSHr	Proteína	<i>Bos taurus</i>	no aplica	96%
InhA	Proteína	<i>Bos taurus</i>	96%	82%
AMH	Proteína	Humano 560aa	597aa	565aa
AMHr	Proteína	Humano 573aa	574aa	544aa
FSHr	Proteína	<i>Bos taurus</i> 695aa	695aa	695aa
InhA	Proteína	<i>Bos taurus</i> 360aa	360aa	360aa

Discusión

Los parámetros reproductivos de los animales utilizados en este experimento son comparables con lo informado en la literatura para búfalos¹⁹ y para vacunos²⁰, y la búsqueda de explicaciones a estas diferencias son la base de la presente investigación. No confirmar los polimorfismos hallados en el ganado Holstein por otros autores, aun confirmando que tienen la misma función entre las especies,^{21, 22} lleva a replantear la forma de estudiar los fenómenos que se observan o a analizarlos de manera distinta. Existen algunos argumentos que favorecen las posibilidades de no encontrar correlaciones entre la estructura de los genes y la función, Cory *et al.* evaluaron 10 polimorfismos en los exones del Gen FSHr en bovinos de la raza Holstein y encontraron que siete producían mutaciones silenciosas¹⁴, otros autores han informado que ciertos SNP en los genes de interés no se asocian con parámetros reproductivos²³. Estas evidencias han obligado a los investigadores a incluir algunos aspectos técnicos de la investigación como parte de la discusión de los resultados.

Si bien es cierto que se ha informado en mujeres la existencia de un SNP en el gen FSHr, asociado a la cantidad de dosis requerida de FSH para superovulación²⁴, en bovinos y sus diferentes razas no se ha confirmado y existe poca evidencia en la literatura sobre el tema. Cory, *et al.*, informaron en diferentes razas de bovinos polimorfismos en el receptor de la FSH¹⁴. Hirayama estudio en Japón algunos polimorfismos del gen FSHr, en vacunos de la raza Japonesa Kedaka asociada con la cantidad de embriones transferibles²⁶, sin embargo hay que notar que si bien es cierto son polimorfismos no son los mismos. Milazotto *et al.*, en el 2008 informó la existencia de polimorfismos

en el ganado Nellore ²⁵ asociados con la pubertad. En referencia con los búfalos se debe mencionar que el receptor fue clonado desde el 2008 ²⁷ sin que hasta la fecha se hayan informado polimorfismos en el gen.

A diferencia de lo que ha pasado en los humanos ³, en los bovinos no se han informado polimorfismos en el gen de la AMH, solamente Nawaz *et al.*, utilizando un chip de marcadores de alta densidad informó de la existencia de un grupo de 11 marcadores SNPs localizados en el cromosoma 11 bovino ², para el caso del AMHr no se encontraron informes sobre polimorfismos en las especies de bovinos estudiadas.

Inhibina A, Sang *et al.*, han informado asociación de polimorfismos con parámetros reproductivos en animales de la raza Holstein ²⁸, no se han informado estudios similares en vacunos, cebuinos o bufalinos.

La comparación de las secuencias de los genes de las dos especies estudiadas mostró una gran homología, aun comparando con el patrón *Bos taurus* y como era de esperarse la mayor divergencia se dio con los humanos. Cuando se comparan las secuencias de AMH y AMHr2 de los bovinos entre si la homología es bastante grande. Debe hacerse notar que para algunos genes como el FSHr y el AMHr2, no se ha reportado la secuencia de RNA, ni la secuencia de la proteína para los bovinos estudiados. Desde el punto de vista de la función, la estructura y la secuencia de las proteínas es bastante similar entre todas las especies y genes evaluados.

Con el conocimiento moderno, pudiera pensarse que para la obtención de amplificadores, debiera haberse analizado primero una secuencia de *primers* o diseñado algunos específicos para amplificar las mismas regiones estudiadas, pero el equipo de investigación decidió probar las secuencias descritas en los controles escogidos, basado fundamentalmente en la homología de secuencias de RNA y la función de los genes, puede que metodológicamente sea incorrecto pero fisiológicamente tiene muchísimo sentido.

Después de evaluar los resultados, se analizó si los *primers* reconocían las mismas secuencias que habían sido informadas en la literatura, con la gran sorpresa que a pesar de todas las gran homología, ninguno de los *primers* usados reconocía secuencias de los genes propuestos en las especies propuestas, evidenciando las diferencias en secuencia, pero lo más importante es que la información no debe ser extrapoladas tan fácilmente entre especies y en este caso tan cercanas filogenéticamente, no olvidar que la función de la proteína no se altera, aun con las diferencias en secuencia planteadas.

La interrelación de las proteínas en este estudio es bastante grande, AMH y la expresión de su receptor (AMHr2) controlan la población de folículos primordiales que tiene la hembra bovina, estos folículos deben desarrollar receptores para la FSH y convertirse en folículos preantrales para que se dé el proceso ovulatorio. Para que se de el tránsito de folículo antral a ovulatorio aparecen las otras hormonas estudiadas en este trabajo, InhA, IGF1, adicionalmente InhA controla la secreción de FSH a nivel hipofisiario ^{29 30}. Finalmente, AMH e InhA pertenecen a la familia del factor transformante- β (TGF β), cuya actividad es crítica para el control del crecimiento, diferenciación y destino celular.

La forma cómo actúan los genes estudiados y sus receptores, corresponden a moléculas extracelulares que están involucradas en el envío de señales dentro de la célula, bien sea a través de proteínas G o mediante la activación del SMAD, esta evidencia fortalece la idea de ver la función de las gonadotropinas con una relación de espacio-temporalidad así pues la misma molécula puede tener diferente función dependiendo el momento y lugar, en consecuencia los análisis tienen obligatoriamente dos enfoques, el que tiene que ver con el momento reproductivo del individuo, pudiera decirse momento del ciclo estral o de la onda folicular y el segundo con los aspectos básicos de biología celular que cada tejido y órgano tiene que cumplir y que han evolucionado a la par con las especies.

Este estudio demuestra como la homología en la función no quiere significar que haya necesariamente una homología en estructura de los genes y proteínas, especialmente cuando se quieren extrapolar los resultados en otras especies donde la información es escasa o inexistente como en este caso los búfalos.

La identificación de SNP o en general de polimorfismos, no necesariamente tienen que tener relación de causalidad, estos polimorfismos de los que no se duda su existencia pueden servir de marcadores de la función reproductiva. Teniendo claro que para lograr este objetivo hay que tener en cuenta el tamaño de la muestra, los aspectos genéticos del mismo y la naturaleza del fenotipo observado lo que nos vuelve a la gran discusión entre la estructura del gen y la función, adicionalmente plantea interrogantes sobre el control génico que pueden estar relacionados con la función, pero no necesariamente que sean los mismos entre las especies.

Conclusiones

De los resultados obtenidos en este trabajo no se pudieron confirmar en los vacunos *indicus* y los búfalos los polimorfismos descritos en otras especies, aun demostrando que existen diferencias en parámetros reproductivos. No se puede confirmar que el estudio comparativo entre especies permita obtener información de la biología de la reproducción al menos para el caso del desarrollo folicular y los parámetros reproductivos, que cada genoma requiere su propio estudio y análisis antes para poder proponer las posibles correlaciones con fenotipos escogidos. Se requiere entonces hacer un análisis de las regiones propuestas para comparación en búfalos y vacunos *indicus*, para poder proponer estrategias de análisis o diseñar experimentos que permitan explicar los fenómenos observados.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, por el apoyo al proyecto "Identificación de polimorfismos en genes asociados a la reserva ovárica y proteómica de oocitos en vacunos y búfalinos", Código HERMES 39456 y la Asociación Colombiana de Criadores de Búfalo por el apoyo al estudiante doctoral.

Referencias

1. de Camargo GMF, Aspilcueta-Borquis RR, Fortes MRS *et al.* Prospecting major genes in dairy buffaloes. *BMC Genomics* 2015; 16 (1): 872.
2. Nawaz MY, Jimenez-Krassel F, Steibel JP *et al.* Genomic heritability and genome-wide association analysis of anti-Müllerian hormone in Holstein dairy heifers. *J Dairy Sci* 2018; 101 (9): 8063-8075.

3. Rigon C, Andrisani A, Forzan M *et al.* Association study of AMH and AMHRII polymorphisms with unexplained infertility. *Fertil Steril* 2010; 94: 1244–1248. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028209011017>.
4. 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 Medellín* 2016; 69 (1): 7793-7801.
5. Kevenaar ME, Themmen APN, Laven JSE *et al.* Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor polymorphisms are associated with follicular phase estradiol levels in normo-ovulatory women. *Hum Reprod* 2007; 22(6): 1547-1554.
6. Pangas SA. Regulation of the ovarian reserve by members of the transforming growth factor beta family. *Mol Reprod Dev* 2012; 79 (10): 666-679.
7. Cardoso RC, Alves BRC, Williams GL. Neuroendocrine signaling pathways and the nutritional control of puberty in heifers. *Anim Reprod* 2018; 15(Supplement 1): 868-878.
8. McGee EA, Hsueh AJW. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000. 21(2): 200-214
9. Cardozo E, Pavone ME, Hirshfeld-Cytron JE. Metabolic syndrome and oocyte quality. *Trends Endocrinol Metab* 2011; 22: 103–9. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104327601000202X>.
10. Khan DR, Landry DA, Fournier É *et al.* Transcriptome meta-analysis of three follicular compartments and its correlation with ovarian follicle maturity and oocyte developmental competence in cows. *Physiol Genomics* 2016; 48 (8): 633-643.
11. Knight PG, Glister C. TGF- superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006. 132 (2): 191-206.
12. La Marca A, Volpe A. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: Is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006: 603–610.
13. Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C *et al.* Isolation of the bovine and human genes for müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* Cell Press, 1986; 45: 685–698.
14. Cory AT, Price CA, Lefebvre R *et al.* Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine follicle-stimulating hormone receptor and effects of genotypes on superovulatory response traits. *Anim Genet* 2013; 44 (2): 197-201.
15. Yang WC, Li SJ, Tang KQ *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* 2010; 119 (3-4): 172-177.
16. Todoroki J, Noguchi J, Kikuchi K *et al.* Plasma concentrations of inhibin a in cattle with follicular cysts: Relationships with turnover of follicular waves and plasma levels of gonadotropins and steroid hormones. *Domest Anim Endocrinol* 2004; 27 (4): 333-344.

17. Tang K-Q, Li S-J, Yang W-C *et al.* An MspI polymorphism in the inhibin alpha gene and its associations with superovulation traits in Chinese Holstein cows. *Mol Biol Rep* 2011; 38: 17–21.
18. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple *salting out* procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16 (3), 1215.
19. Bolívar-Vergara DM, Ramírez Toro EJ, Agudelo-Gómez DA *et al.* Parámetros Genéticos para Características Reproductivas en una Población de Búfalos (*Bubalus bubalis* Artiodactyla, Bovidae) en el Magdalena Medio Colombiano. *Rev Fac Nac Agro* 2010; 63: 5587–5594.
20. Oscar Vergara G, Luz Botero A, Caty Martínez B. Factores ambientales que afectan la edad al primer parto y primer intervalo de partos en vacas del sistema doble proposito. *Rev MVZ Cordoba* 2009; 14: 1594–1601.
21. Li J, Li Z, Liu S *et al.* Transcriptome studies of granulosa cells at different stages of ovarian follicular development in buffalo. *Anim Reprod Sci* 2017; 187: 181–192.
22. Hayes E, Kushnir V, Ma X *et al.* Intra-cellular mechanism of Anti-Müllerian hormone (AMH) in regulation of follicular development. *Mol Cell Endocrinol* 2016; 433: 56–65.
23. Marson EP, Ferraz JBS, Meirelles F V. *et al.* Effects of polymorphisms of LHR and FSHR genes on sexual precocity in a *Bos taurus* x *Bos indicus* beef composite population. *Genet Mol Res* 2008; 7 (1): 243–251.
24. Simoni M, Tempfer CB, Destenaves B *et al.* Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part I: Polycystic ovary syndrome and ovarian response. *Hum Reprod Update* 2008; 14 (5): 459–484.
25. Milazzotto MP, Rahal P, Nichi M *et al.* New molecular variants of hypothalamus-pituitary-gonad axis genes and their association with early puberty phenotype in *Bos taurus indicus* (Nellore). *Livest Sci* 2008; 114 (2-3): 274–279.
26. Hirayama H, Naito A, Fujii T, Sugimoto M, Takedomi T, Moriyasu S, Sakai H KS. Effects of genetic background on responses to superovulation in Japanese Black cattle. *J Vet Med Sci* 2019; 81: 373–378.
27. Minj A, Mondal S, Tiwari AK *et al.* Molecular characterization of follicle stimulating hormone receptor (FSHR) gene in the Indian river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Gen Comp Endocrinol* 2008; 158 (2): 147–153
28. Sang L, Du Q-Z, Yang W-C *et al.* Polymorphisms in follicle stimulation hormone receptor, inhibin alpha, inhibin bata A, and prolactin genes, and their association with sperm quality in Chinese Holstein bulls. *Anim Reprod Sci* Elsevier B.V., 2011; 126: 151–6.
29. Bernard DJ, Chapman SC, Woodruff TK. An emerging role for co-receptors in inhibin signal transduction. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2001. 180 (1-2): 55–62.
30. Sasaki K, Medan MS, Watanabe G *et al.* Immunization of Goats against Inhibin Increased Follicular Development and Ovulation Rate. *J Reprod Dev* 2006; 52 (4): 543–50.