

NOTA TÉCNICA

Optimización del análisis de polimorfismos conformacionales de cadena simple. Caso gen del receptor de hormona Luteinizante bovino

Optimization of single-strand conformational polymorphisms analysis. Bovine luteinizing hormone receptor gene case

Belkys J. Vásquez Marín^{1*}, Oscar De La Rosa¹, Alexis F. Márques Urdaneta¹, Geomar Seijas Pedroza², y José A. Aranguren Mendez³

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP). Aragua, Venezuela. Correo electrónico: belkysvasquez68@gmail.com. ²Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias Veterinarias. Mérida. ³Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Zulia, Venezuela.

RESUMEN

Con el objeto de optimizar el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP) para la detección y genotipado de los polimorfismos nucleotídicos simples (SNP) presentes en una región del gen receptor de hormona Luteinizante (LHR) bovino, se realizó un experimento en dos fases. En la primera se realizó un tamizaje molecular de 173 individuos mediante un análisis SSCP exploratorio. Las muestras que presentaron patrones electroforéticos diferenciales fueron secuenciadas y aquellas con variaciones nucleotídicas identificadas fueron utilizadas en la segunda fase para la optimización de la metodología SSCP. Se evaluaron las condiciones de la electroforesis variando la relación acrilamida/bis-acrilamida, porcentaje de la mezcla, intensidad de corriente, porcentaje de glicerol y duración de la electroforesis. Los geles fueron teñidos en una solución de SYBER®safe, 0,7%, durante 25 minutos en agitación suave y los patrones electroforéticos fueron visualizados mediante un transiluminador UV. La optimización de la técnica fue asumida basada en la separación, nitidez y perceptibilidad de las bandas así como la detección de las mutaciones. Se consideró como optimizado el sistema electroforético I. Se confirmó la presencia del SNP rs41256848, además de la detección de una variante ubicada en la posición 1337 de la secuencia de referencia NM_174381.1. En esta investigación se optimizó un procedimiento práctico para la detección y genotipado de los polimorfismos presentes en el fragmento de LHR bovino estudiado.

Palabras clave: Polimorfismos, ADN, SNP, SSCP, receptor, Luteinizante, bovino.

ABSTRACT

In order to optimize the single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis, for detection and genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNP) present in the bovine luteinizing hormone receptor gene (LHR), an experiment was conducted in two phases. First, a molecular screening was performed by exploratory SSCP on 173 individuals. Samples showing differential electrophoretic patterns were sequenced and those with identified nucleotide variations were used in the second stage for optimizing the SSCP method. Electrophoresis conditions were evaluated by varying the acrylamide/bis-acrylamide relationship, percentage mix, current, glycerol percentage and duration electrophoresis. Gels were stained in a solution of SYBER®safe, 0.7%, for 25 minutes under gentle stirring and electrophoretic patterns were visualized through an UV transilluminator. Optimization was assumed based on separation, sharpness and perceptibility of the bands and mutations detection. Was regarded as optimized the electrophoretic system I. The SNP rs41256848 was confirmed, also a variant located at position 1337 of the reference sequence NM_174381.1. In this research a practical method for detection and genotyping of polymorphisms present in the bovine LHR gene was optimized.

Keywords: Polymorphism, DNA, SNP, SSCP, receptor, luteinizing, bovine.

Recibido: 01/04/14 Aprobado: 20/02/15

INTRODUCCIÓN

La detección y el estudio de la variación genética son primordiales para dilucidar la relación existente entre el genoma y el fenotipo de los individuos; esto permitiría mejorar la comprensión de la variación fenotípica en las especies ganaderas (FAO, 2007).

En estas especies, el conocimiento de la variación nucleotídica a través del genoma permitiría un desarrollo más efectivo de herramientas útiles para mejorar el diagnóstico de enfermedades genéticas, así como de las estrategias de selección y mejoramiento genético animal para rasgos productivos y reproductivos.

En el caso de los rasgos reproductivos, se han descrito varios genes como candidatos posicionales y biológicos para el control de estos rasgos, tales como *IGF1* factor de crecimiento insulínico 1; *LEP* Leptina; *FSHR* receptor de hormona folículo estimulante; *PR* receptor de progesterona; *GnRHR* receptor de hormona liberadora de gonadotropinas y *LHR* receptor de hormona Luteinizante, (Kim *et al.*, 2009; Liefers *et al.*, 2005; Milazzotto *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011).

En cuanto al gen *LHR* (receptor de hormona Luteinizante), se conoce que codifica a la proteína LHR; esta proteína pertenece a la superfamilia de receptores acoplados al nucleótido Guanina o proteína G (Ascoli *et al.*, 2002). Tiene un rol fundamental en la regulación de la actividad reproductiva, ya que la acción de la hormona luteinizante (*LH*) se produce por la unión a este receptor (Davis, 1994). Así mismo, interviene en la esteroidogénesis ovárica y ovulación en la hembra, además de la producción de testosterona en las células de Leydig del testículo (Ascoli *et al.*, 2002).

De acuerdo a un reporte previo (Huhtaniemi, 2000), se ha detectado la presencia de mutaciones naturales en el dominio transmembrana de *LHR*; donde algunas de ellas promueven alteraciones de la función reproductiva en humanos. En ganado bovino se han detectado polimorfismos tanto en las regiones intrónicas como codificantes (Hastings *et al.*, 2006). Algunos de los que han sido detectados en el exón 11 han sido asociados a rasgos de fertilidad (Yu *et al.*, 2012). Con base a lo anterior, el conocimiento

de la variación nucleotídica de este exón podría permitir el desarrollo de estrategias para la clasificación en grupos genéticos o predicción del desempeño reproductivo en ganado bovino.

Además, es importante destacar que la mayoría de la variación nucleotídica se encuentra en la forma de polimorfismo nucleotídico simple *SNP*, (Iniesta *et al.*, 2005), siendo su densidad muy alta en los genomas de diversos organismos (Vignal *et al.*, 2002), por lo que se requiere de tecnologías adecuadas a fin de catalogar la diversidad nucleotídica en las poblaciones bovinas. La técnica de elección para evaluar esta diversidad sería la secuenciación de ADN. Sin embargo, en Venezuela todavía constituye una metodología costosa cuando se trata de evaluar un gran número de individuos.

Existen una amplia variedad de métodos que son utilizados para la detección de *SNPs* y que pueden minimizar el impacto del alto costo de la secuenciación de ADN, incluyendo las técnicas *PCR-RFLP*, *Ecotilling*, *análisis de heteroduplex* y *DGGE* (Kakavas *et al.*, 2008; Marson *et al.*, 2008; Till *et al.*, 2006). No obstante, un solo método no es aplicable a todos los problemas de investigación; debe seleccionarse el más adecuado para el estudio que se esté realizando. En el caso de la detección de nuevos polimorfismos, existen herramientas tecnológicas de alto rendimiento y baja relación costo-beneficio, como el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena simple (*SSCP*; Orita *et al.*, 1989).

La ejecución de la técnica *PCR-SSCP* involucra la amplificación por PCR de un segmento de interés, después la desnaturalización del ADN bicatenario (ADNbc) del fragmento amplificado, utilizando una combinación de calor y formamida, seguido de un enfriamiento rápido de la muestra para impedir el apareamiento complementario del ADN monocatenario (ADNmc); finalmente se procede a la separación electroforética en un soporte no desnaturalizante (Teschauer *et al.*, 1996).

Si los fragmentos de ADNmc difieren en un nucleótido simple, se promoverá la adopción de conformaciones tridimensionales diferentes en las cadenas simples (Nataraj *et al.*, 1999). En consecuencia, los cambios conformacionales promoverán que las cadenas simples exhiban movi­lidades electroforéticas diferentes entre sí,

e incluso con el ADN de doble cadena (Nataraj *et al.*, 1999; Dong y Zhu, 2005; Gasser *et al.*, 2007; Kakavas *et al.*, 2008). Una vez realizada la electroforesis, los fragmentos de ADN pueden ser visualizados mediante técnicas diversas como la auto radiografía de los segmentos marcados, tinción con plata o con bromuro de etidio y por fluorescencia a través del uso de cebadores fluorescentes (Kakavas *et al.*, 2008).

El análisis *SSCP* proporciona una potente herramienta para la identificación de patógenos, evaluación de la variación genética dentro y entre muestras o poblaciones y como punto importante, permite identificar mutaciones desconocidas por lo que ha sido utilizado para descubrir y genotipar *SNPs* en diversos genomas (Cerquera *et al.*, 2009; Sunnucks *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2001; González *et al.*, 2006; Dong y Zhu, 2005; Paixão *et al.*, 2006; Kakavas *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010; Pazzola *et al.*, 2010; Estrada-Cuzcano, 2013). Adicionalmente, esta técnica tiene ventaja sobre otras metodologías basadas en PCR para la detección de mutaciones, debido a su simplicidad técnica (Kakavas *et al.*, 2008; Hayashi, 1991).

Basado en lo anterior, el análisis *SSCP* constituye una técnica útil para identificar y genotipar polimorfismos en los genes que intervienen en el proceso reproductivo del ganado bovino, específicamente *LHR*. No obstante, es conocido el hecho de que la tasa de detección de *SNPs* por la técnica *SSCP* varía en función de diversos factores como el tamaño del producto PCR evaluado, la temperatura a la cual se realiza la electroforesis, composición de la matriz (relación acrilamida/bis-acrilamida), naturaleza del tampón y la adición de glicerol (Kalvatchev y Draganov, 2005).

En Venezuela no existen reportes previos de la aplicación de este análisis para la identificación y genotipado de polimorfismos en la especie bovina. Los resultados reportados en estudios realizados en otros países están referidos a fragmentos de PCR específicos, y las condiciones *SSCP* utilizadas no pueden aplicarse al fragmento del gen *LHR* objeto de este estudio.

Por esta razón, el objetivo planteado en la presente investigación fue el de optimizar el

análisis *PCR-SSCP* a fin de detectar y genotipar las variaciones nucleotídicas presentes en el exón 11 del gen receptor de hormona Luteinizante bovina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este experimento se realizó en dos fases; en la primera fase se realizó un tamizaje molecular de 173 individuos mediante un análisis *SSCP* exploratorio. Las muestras que presentaron patrones electroforéticos diferenciales fueron secuenciadas y aquellas con variaciones nucleotídicas identificadas, fueron utilizadas en la segunda fase para la optimización de la metodología *SSCP*.

Fase 1. Obtención y amplificación de ADN

Se utilizaron 173 muestras pertenecientes al banco de ADN del Laboratorio de Biotecnología Agrícola del INIA-ESAT, provenientes de rebaños bovinos Carora (98) y Criollo Limonero (75) ubicados en los estados Lara, Zulia y Aragua. El ADN genómico fue aislado a partir de sangre periférica refrigerada y conservada con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

Se utilizó una metodología de precipitación salina reportada por De La Rosa *et al.* (2013), la cual se describe brevemente; 400µl de cada muestra se solubilizaron con 1000µl de un tampón (Tris-Cl 20mM; pH 7,6) y se incubaron a temperatura ambiente por diez minutos. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 20.800 RCF (fuerza centrífuga relativa) por 20s y el sobrenadante fue descartado.

Se incubaron las pastillas resultantes en una solución de lisis (EDTA 1mM, Tris-Cl 10mM, 0,1% SDS; pH 8) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Los residuos proteicos fueron digeridos con proteínasa K (2,5µl, 20 mg.ml⁻¹) durante cuatro horas a 55°C. Para precipitar los residuos peptídicos se utilizó acetato de potasio 5M y centrifugación a 20.800 RCF. El sobrenadante se mezcló con una solución de etanol absoluto y acetato de sodio 0,12M a fin de promover la precipitación del ADN. Una vez aislado, el ADN fue lavado dos veces con etanol al 70% y solubilizado en un tampón de conservación (Tris 10mM, EDTA 1mM; pH 8), la integridad del ADN fue verificado por electroforesis en

geles de agarosa al 0,8% con SYBR®Safe incorporado (1/50.000) y la concentración total de ADN en las muestras se determinó mediante espectrofotometría óptica. Una vez realizado esto, el ADN se mantuvo congelado a -56°C hasta la realización de los análisis.

Se utilizó el par de cebadores (F- CAAACTGACAGTCCCCCGCTTT; R- CCTCCGAGCATGACTGGAATGGC) descritos por Milazzotto *et al.* (2008), para amplificar mediante PCR un fragmento de 303pb correspondiente a la región de interés del exón 11 del gen *LHR*. Se utilizó el estuche comercial GoTaq® Flexi (Promega) para las reacciones de amplificación. La mezcla de PCR tuvo un volumen total de reacción de 15 μL , con las proporciones siguientes: buffer 1X, MgCl_2 2,1 mM, dNTPs 0,2 mM, cada oligo 0,2 μM , Taq 1 U y 50 ng de ADN genómico. Se utilizó un termociclador GenePro™ (Bioer Technology) y un programa Touchdown (Korbie y Mattick, 2008), tal y como se especifica en el Cuadro 1.

Técnica de SSCP exploratoria

Una vez realizada la PCR, se adicionó a cada amplicón una solución desnaturizante (formamida 95%: azul de bromofenol 0,5%: EDTA 25 mM) en una proporción 2:1 (ADN: solución). La mezcla se desnaturizó a 95°C durante 10 minutos, seguido de un enfriamiento rápido. Luego, se colocaron a -20°C durante

10 minutos; pasado este tiempo se procedió a realizar las electroforesis en geles de poliacrilamida.

Para la obtención de los patrones SSCP, el fragmento de *LHR* fue resuelto en geles de poliacrilamida no desnaturizante (37,5:1 acrilamida/bisacrilamida, desgasificada por 30 min en una bomba de vacío, BIORAD Hydrotech™), al 6%, en buffer Tris Borato EDTA 0,5 x (TBE), 2% de glicerol, durante 3:00 horas, a 30 mA constantes. Se utilizaron cámaras de electroforesis vertical duales ajustables (C.B.S Cientific, SG-400-20, EUA), con vidrios de 20cm x 22cm, peines y separadores plásticos de 2 mm de espesor. Todas las electroforesis se realizaron a una temperatura ambiental controlada entre 17°C y 19°C . Posterior a la electroforesis, los geles fueron teñidos en una solución de TBE (0,5X) y SYBER®safe, al 0,7%, durante 25 minutos en agitación suave y los patrones electroforéticos fueron visualizados a través de un transiluminador UV UVITEC (Uviprochemi).

Secuenciación de ADN a partir de las muestras con patrones electroforéticos diferenciales

Las muestras representativas de cada patrón electroforético diferencial se amplificaron nuevamente mediante PCR y los amplicones obtenidos fueron sometidos a un protocolo de secuenciación capilar estándar (Macrogen Inc.,

Cuadro 1. Programa touchdown para la reacción de PCR del fragmento estudiado del exón 11 de *LHR*.

Fase PCR		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial		95°C	5min
Desnaturalización		95°C	30seg
Hibridación ($-1^{\circ}\text{C}/\text{c}$)*	Ciclos 10	61°C	30seg
Extensión		72°C	45seg
Desnaturalización		95°C	30seg
Hibridación	Ciclos 20	51°C	30seg
Extensión		72°C	45seg
Extensión final		72°C	10min

*Disminución de 1°C en cada ciclo de la primera ronda de amplificación.

Corea), en ambos sentidos. Las secuencias fueron editadas y alineadas entre sí utilizando los programas DNABaser (Romania: Heracle BioSoft SRL) y CodonCodeAligner (CodonCodeCorporation, EUA). La secuencia consenso fue comparada con la referencia NM_174381.1 (Pruitt *et al.*, 2013). Se compararon los *SNPs* detectados con aquellos existentes en la base de datos del Centro Nacional de Investigación Biotecnológica NCBI (Sherry *et al.*, 2001). A partir de las secuencias obtenidas, se determinaron los genotipos de cada muestra.

Fase 2. Amplificación de ADN

Las muestras que presentaron *SNPs* fueron reamplificadas siguiendo la metodología de la fase 1.

Optimización de la técnica de SSCP

Para optimizar las condiciones de la electroforesis se varió la relación de acrilamida/bis-acrilamida, porcentaje de la mezcla, intensidad de corriente, porcentaje de glicerol y duración de la electroforesis (Cuadro 2), definiéndose siete sistemas. Todas las electroforesis se realizaron a temperatura ambiental entre 17°C y 19°C.

Los criterios tomados para seleccionar un sistema fueron separación, nitidez y perceptibilidad de las bandas así como la discriminación de las variantes genotípicas de los *SNPs* en función de los patrones *SSCP*. En el caso en que dos condiciones electroforéticas permitieran la detección de los *SNPs*, se utilizó el criterio de

tipo económico para la selección de la condición electroforética.

Correspondencia de los *SNPs* identificados con los patrones *SSCP* obtenidos

Se determinó visualmente la correspondencia de los *SNPs* detectados por secuenciación con cada patrón *SSCP* obtenido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase 1. Análisis *SSCP* exploratorio

En el fragmento de *LHR* analizado en la fase 1, se detectaron cuatro patrones electroforéticos (definidos como A, B, C, D) y cinco tamaños moleculares de acuerdo a su movilidad electroforética (Cuadro 3). Este número de patrones obtenidos no coincide con la cantidad de patrones observados por Milazzotto *et al.* (2008) al analizar un fragmento similar.

Durante el desarrollo de la fase 1 del ensayo, se obtuvieron dos patrones de dos bandas (A y B), un patrón de cuatro bandas (C) y un patrón de tres bandas (D), cada uno con una banda adicional correspondiente al ADN bicatenario (Figura 1).

Según Humphries *et al.* (1997), un producto de PCR representa la amplificación de dos alelos, uno de cada par autosómico; de manera que al evaluar secuencias provenientes de individuos homocigotos y heterocigotos, los patrones de bandas que deberían obtenerse son dos y cuatro

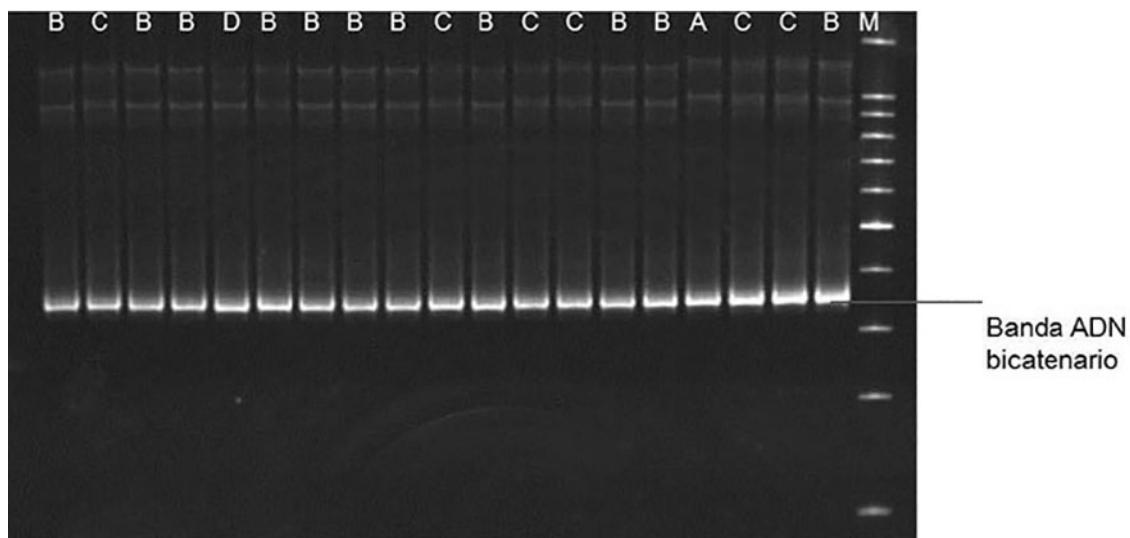
Cuadro 2. Condiciones de la electroforesis utilizadas en el experimento B.

Sistema	Relación Acrilamida/Bis-acrilamida	Porcentaje de la mezcla	Glicerol	Amp/Watts	Tiempo corrida (h)
I	37,5:1	6%	5%	30 mA	3:30
II	49:1	10%	4%	12 W	5
III	49:1	10%	4%	15 W	6
IV	49:1	10%	7%	12 W	6:45
V	49:1	10%	4%	15 W	7
VI	100:1	10%	4%	15 W	4:30
VII	100:1	12%	4%	12 W	6

Cuadro 3. Tamaños moleculares de los patrones SSCP obtenidos a partir de la movilidad electroforética del fragmento estudiado de *LHR* bovino durante la fase 1.

Producto PCR de <i>LHR</i>	Patrones SSCP			
	A	B	C	D
Fragmento de 303 pb ubicado entre 1182 y 1484	900/1300	1000/1350	900/1000/1300/1350	900/1250/1300

Patrón SSCP (pb): Tamaño molecular de las bandas obtenidas
Modificado de Vásquez *et al.* (2014).



Letras A, B, C y D identifican los patrones electroforéticos.
M = Marcador de peso molecular (100 pb).

Figura 1. Imagen de las bandas de ADN monocatenario y bicatenario obtenidas.

bandas simples respectivamente, además de una banda adicional por el ADN de doble cadena, ubicado en una posición adelantada en el gel comparado con las cadenas simples de ADN. De acuerdo a lo reportado por este autor, los dos patrones de dos bandas (A y B), podrían corresponder a los dos homocigotos, el patrón de cuatro bandas (C) al heterocigoto, y el patrón de tres bandas (D), correspondería a un patrón atípico.

Por otra parte, se pudo constatar que los patrones A, B y C son similares, en cuanto al número de bandas obtenido, a los patrones reportados por Yu *et al.* (2012). Estos investigadores analizaron la misma región de *LHR* bovino evaluada en el

presente ensayo, en un fragmento de menor tamaño, A pesar de que la separación y nitidez de las bandas obtenidas por estos investigadores es mayor, discriminándose rápidamente la diferencia entre los patrones electroforéticos.

El contraste entre ambos resultados en cuanto a nitidez y separación de las bandas, podría deberse a que las condiciones de electroforesis utilizadas por estos autores difieren a las utilizadas en la Fase 1 del presente ensayo en cuanto a tamaño del fragmento, relación acrilamida/bisacrilamida (39:1), porcentaje de la mezcla (13%) y tiempo de corrida (8-10 h). Teschauer *et al.* (1996), reportó que un aumento

en el porcentaje de la mezcla del gel, incrementa la nitidez de las bandas.

Polimorfismos nucleotídicos simples (SNPs) detectados mediante secuenciación

Mediante el alineamiento de secuencias generadas de individuos con diferentes patrones electroforéticos se pudo detectar la presencia de dos polimorfismos o SNPs con respecto a la secuencia de referencia NM_174381.1 (Cuadro 4). De éstos, la variación rs41256848 ubicada en la posición g.1410G>T había sido reportada previamente en la base de datos dbSNP (Database of Single Nucleotide Polymorphisms, 2015; Hastings *et al.*, 2006; Jansen *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2012); mientras que la ubicada en g.1337C>T constituye una variante que no había sido reportada en la base de datos de SNP del NCBI (Sherry *et al.*, 2001). A esta secuencia variante se le asignó el número de entrada ss974751668 (Vásquez *et al.*, 2014), y recientemente se le asignó el número de referencia rs523043472 (Database of Single Nucleotide Polymorphisms, 2015). El SNP rs41256848 representa una transversión, mientras que rs523043472 representa una transición.

De acuerdo a los resultados de la secuenciación de ADN, se observaron dos genotipos del SNP rs523043472 y tres genotipos del SNP rs41256848 (Cuadro 5).

Fase 2. Optimización de la técnica SSCP

Las condiciones utilizadas en los sistemas I, II y IV permitieron detectar los cuatro patrones electroforéticos (Figura 2); los sistemas III, V y

VII permitieron la detección de los patrones de dos y tres bandas; sin embargo ninguno de los tres sistemas permitió la detección del patrón de cuatro bandas (Figura 2). En el caso del sistema VI, se obtienen bandas difusas, en las que no se logra distinguir un patrón definido (Figura 2).

Así mismo, el sistema I presentó la mejor separación y definición de bandas comparado con los sistemas II y IV. Según Teshauer *et al.* (1996), la adición de glicerol al gel de poli(acrilamida) puede mejorar la separación de las bandas; por lo cual, el incremento de la cantidad de glicerol hasta 5% en el sistema I, así como el aumento del tiempo de electroforesis podría haber permitido mejorar la separación de las bandas al compararlas con los resultados obtenidos en la fase 1, en los que se utilizaron las mismas proporciones de acrilamida/bisacrilamida, igual porcentaje de mezcla y potencia.

En el caso de los sistemas II y IV, específicamente en los patrones de dos y tres bandas, se observa mayor separación entre las cadenas simples complementarias, mientras que las bandas no complementarias más cercanas en el patrón C casi no se separan; igualmente se observa en esos dos sistemas, mayor nitidez de las bandas. Según Teshauer *et al.* (1996), el incremento en el porcentaje de la mezcla del gel, mejora la resolución de las bandas pero disminuye la separación entre bandas muy cercanas. En el caso del sistema II probablemente se requería un mayor tiempo de electroforesis, lo cual fue corroborado con el sistema IV. Pese a que los sistemas II y IV tienen como desventaja la mayor

Cuadro 4. Polimorfismos nucleotídicos simples (SNP) identificados en el fragmento estudiado del exón 11 del gen *LHR*.

Ubicación en la referencia NM_174381.1	Polimorfismos detectados			
	Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico	Tipo de mutación	Variante
1337	1337C>T	Ala120Val	Transición	rs523043472
1410	1410G>T	Trip144Cys	Transversión	rs41256848

Modificado de Vásquez *et al.* (2014).

Cuadro 5. Genotipos de los *SNPs* 1337C>T Y 1410G>T detectados por secuenciación de ADN en los productos de PCR.

Fragmento	<i>SNPs</i> detectados	
<i>LHR</i>	1337C>T	1410G>T
	CT CC	GG GT TT

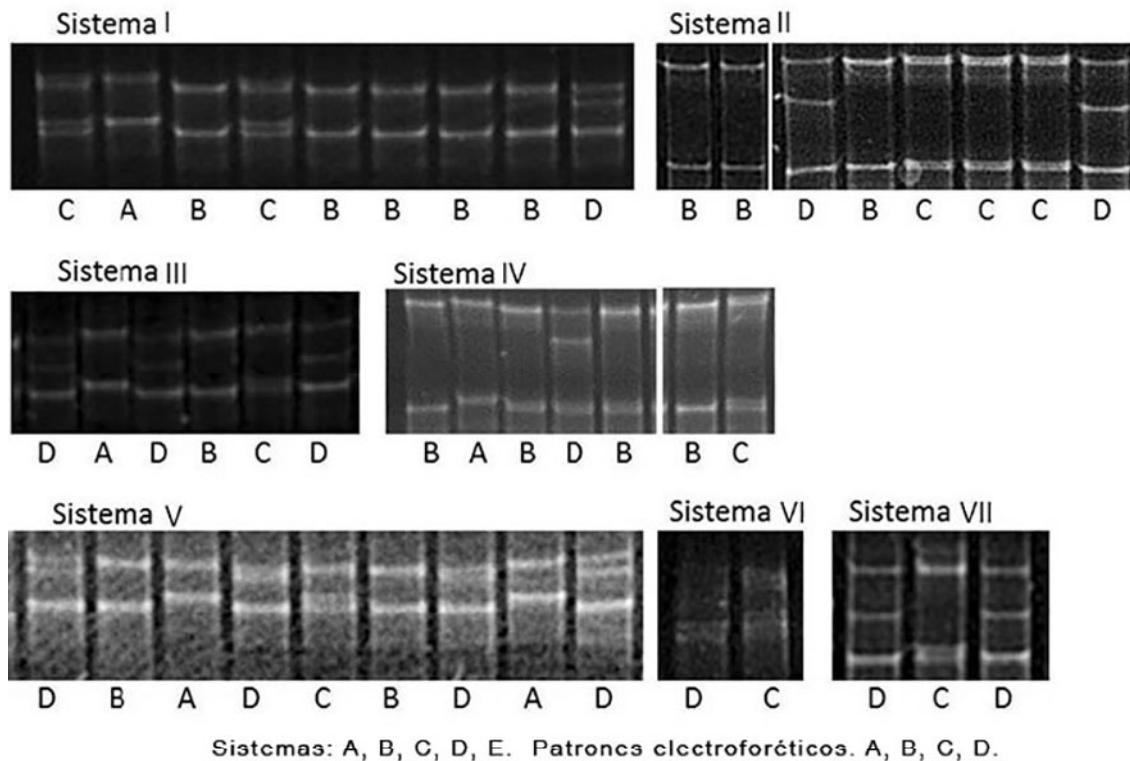


Figura 2. Imágenes de las resoluciones obtenidas con los diferentes sistemas electroforéticos ensayados durante la fase 2.

cantidad de poliacrilamida requerida y el largo tiempo para la electroforesis.

Las condiciones de electroforesis evaluadas en los sistemas I, II y IV permitieron la discriminación de los cuatro patrones electroforéticos. Pero, la calidad de la imagen obtenida varió con cada condición electroforética (Figura 2), y difieren en cuanto a la separación y nitidez de las bandas.

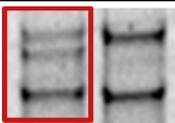
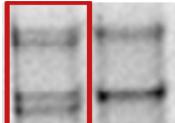
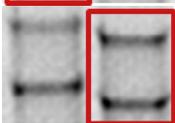
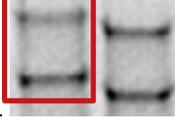
Es importante resaltar que el factor temperatura fue determinante durante la ejecución de los ensayos; el incremento de la temperatura ambiental por encima de los 19°C, promovió bandas de deficiente resolución.

Correspondencia de los *SNPs* detectados con los patrones *SSCP* obtenidos

La determinación de la correspondencia de cada patrón *SSCP* con las variantes alélicas de los *SNPs* detectados por secuenciación fue complicada debido a la presencia de dos *SNPs* en el fragmento amplificado del exón 11, por lo que los patrones electroforéticos son el resultado de las cuatro combinaciones alélicas presentes en la muestra poblacional estudiada (Cuadro 6).

Los patrones A y B corresponden a los individuos homocigotos para ambos *SNPs*; la diferencia en el desplazamiento de las bandas la produce la variación rs41256848, es decir tienen el

Cuadro 6. Correspondencia de los patrones electroforéticos en el fragmento estudiado del exón 11 del gen *LHR* con los SNPs 1337C>T Y 1410G>T.

Fragmento	Patrón SSCP	1337C>T	1410G>T	
LHR	D		CT	GG
	C		CC	GT
	B		CC	GG
	A		CC	TT

Modificado de Vásquez *et al.* (2014). El recuadro rojo indica el patrón SSCP correspondiente a la combinación genotípica de ambos SNPs. La imagen que no tiene recuadro rojo es con fines comparativos.

mismo genotipo para el *SNP* rs523043472, pero difieren en el segundo *SNP*. En cuanto al patrón C, se puede observar que es homocigoto para la variación rs523043472 y heterocigoto para el *SNP* rs41256848.

En cuanto a la aparición del patrón D, los hallazgos de la secuenciación de ADN permiten discernir que este patrón SSCP es consecuencia de la combinación de ambos SNPs (rs523043472 en heterocigosis y rs41256848 en homocigosis), ya que al estudiar los resultados reportados por Yu *et al.* (2012), podemos observar que estos investigadores detectan el *SNP* rs41256848, pero no la variante rs523043472.

Así mismo, debido a que en este ensayo, los patrones A, B y C observados y los genotipos de rs41256848 detectados por secuenciación, coinciden con los patrones y genotipos observados por Yu *et al.* (2012), se asume que la presencia de la variante rs523043472 en homocigosis CC no enmascara los patrones A, B y C; sin embargo, sí este *SNP* se presenta en heterocigosis CT, se promueve la aparición de un patrón SSCP diferente (D).

CONCLUSIONES

Se destaca la optimización de la técnica *PCR-SSCP* mediante el desarrollo de condiciones adecuadas y repetibles que permiten con una eficiencia alta, la detección y discriminación de las variantes genotípicas de los *SNPs* rs523043472 y rs41256848 ubicados en las posiciones 1337 y 1410 de la secuencia de referencia NM_174381.1 del gen *LHR* bovino.

Igualmente, se determina que las condiciones óptimas para la detección de los *SNP* son las descritas en el sistema I. Estas condiciones incluyen relación acrilamida/bis-acrilamida, porcentaje de la mezcla, potencia, porcentaje de glicerol, tiempo de electroforesis y temperatura ambiental (Cuadro 2).

Así mismo, el incremento del porcentaje de glicerol y el tiempo de electroforesis a 5% y 3:30 horas respectivamente, mejoró la nitidez y separación de las bandas.

AGRADECIMIENTO

Es importante destacar, que los autores de esta investigación reconocen y agradecen el apoyo del

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) y de la Escuela Socialista de Agricultura Tropical (ESAT) por el apoyo financiero para la ejecución del trabajo experimental.

LITERATURA CITADA

- Ascoli, M., F. Fanelli and D. L. Segaloff. 2002. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocrine Reviews*, 23(2), 141-174.
- Bastos, E., A. Cravador, J. Azevedo and H. Guedes-Pinto. 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in the Portuguese indigenous sheep breed "Churra da Terra Quente". *Biotechnology, agronomy, society and environment*. 5(1), 7-15.
- Cerquera, F., O. Toro y G. Alberto. 2009. Frecuencias alélicas para variantes SNP en el gen Nramp1 en bovinos infectados con *Brucella abortus* o clasificados por resistencia al patógeno. *Revista Corpoica (Colombia)*, 10, 43-50.
- Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). 2015. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. dbSNP accession: {rs41256848 – rs523043472}, (dbSNP Build ID: {126/143 – 142/143}). Available on line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/24/03/15>. [Mar. 24, 2015].
- Davis, J. 1994. Mechanisms of hormone action: luteinizing hormone receptors and second-messenger pathways. *Current opinion in obstetrics gynecology*. 6:254- 261.
- De La Rosa, O., A. Márques, B. Vásquez, G. Seijas y L. Dickson. 2013. Optimización de un protocolo para aislamiento de ADN a partir de sangre periférica en bovinos. Paper presented at the 2do Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación. LOCTI - PEII, Caracas.)
- Dong, Y. and H. Zhu. 2005. Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice. *Methods in molecular medicine*, 108, 149-157.
- Estrada-Cuzcano, A., J. Sandoval, M. Guevara-Fujita y R. Fujita. 2013. Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano. *Revista peruana de biología*, 12(3), 349-358.
- FAO. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. 2007. Rome.
- Gasser, R., M. Hu, N. Chilton, B. Campbell, A. Jex, D. Otranto, C. Cafarchia, I. Beveridge and X. Zhu. 2007. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nature Protocols*, 1(6), 3121-3128.
- González, J., O. Saldarriaga, A. López-Herrera, N. Bermúdez, W. Zapata, J. Ossa, M. Rugeles and G. Bedoya. 2006. Polymorphism in 1908STR1934 locus of the 3' UTR of the Nramp1 bovine gene in eight cattle breeds. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(1), 11-17.
- Hastings, N., S. Donn, K. Derecka, A. Flint and J. Woolliams. 2006. Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. *Animal Genetics*. 37(6): 583-585.
- Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Application Aug*; 1(1):34-8.
- Huhtaniemi, I. 2000. The Parkes lecture. Mutations of gonadotrophin and gonadotrophin receptor genes: what do they teach us about reproductive physiology? *Journal of reproduction and fertility*. 119(2): 173-186.
- Humphries, S., S. Gudnason, V., N. Whittalland and M. Ian. 1997. Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. *Clinical Chemistry* 43:3, 427-435.
- Iniesta, R., E. Guino y V. Moreno. 2005. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria*, 19(4): 333-341.

- Kakavas, V. K., P. Plageras, T. A. Vlachos and A. Papaioannou Noulas. 2008. PCR-SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases. *Molecular biotechnology*, 38(2), 155-163.
- Kalvatchev, Z. and P. Draganov. 2005. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis: a rapid and sensitive method for detection of genetic diversity among virus population. *Biotechnology & biotechnology equipment*. 19/2005/3.
- Kim, E. S., X. Shi, O. Cobanoglu, K. Weigel, P. J. Bergerand and B. W. Kirkpatrick. 2009. Refined mapping of twinning-rate quantitative trait loci on bovine chromosome 5 and analysis of insulin-like growth factor-1 as a positional candidate gene. *Journal of animal science*, 87(3), 835-843.
- Korbie, D. and J. Mattick. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature protocols*, 3(9): 1452 – 1456.
- Liefers, S., R. Veerkamp, M. te Pas, C. Delavaud, Y. Chilliard, M. Platjeand and T. Lende. 2005. Leptin promoter mutations affect leptin levels and performance traits in dairy cows. *Animal genetics*, 36(2), 111-118.
- Marson, E., J. Ferraz, J. Meirelles, J. Balieiro and J. Eler. 2008. Effects of polymorphisms of LHR and FSHR genes on sexual precocity in a *Bos taurus* x *Bos indicus* beef composite population.
- Martínez, R., S. Dunner, R. Toro, J. Tobón, J. Gallego and J. Cañón. 2010. Effect of polymorphisms in the *Slc11a1* coding region on resistance to brucellosis by macrophages in vitro and after challenge in two *Bos* breeds (Blanco Orejinegro and Zebu). *Genetics and Molecular Biology*, 33(3), 463-470.
- Martínez, R., R. Toro, F. Montoya, M. Burbano, J. Tobón, J. Gallego, S. Dunner and J. Cañón. 2008. Bovine *SLC11A1* 3' UTR SSCP genotype evaluated by a macrophage in vitro killing assay employing a *Brucella abortus* strain. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 125(4), 271-279.
- Milazzotto, M. P., P. Rahal, M. Nichi, T. Miranda-Neto, L. A. Teixeira, J. B. S. Ferraz and J. F. Garcia. 2008. New molecular variants of hypothalamus–pituitary–gonad axis genes and their association with early puberty phenotype in *Bos taurus indicus* (Nellore). *Livestock Science*, 114(2), 274-279.
- Nataraj, A., I. Olivos-Glander, N. Kusukawa and W. Highsmith Jr. 1999. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis*, 20(6), 1177-1185.
- Till, B. J., T. Zerr, L. Coma and S. Henikoff. 2006. A protocol for TILLING and Ecotilling in plants and animals. *Nature Protocols* 1, 2465 - 2477.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi and T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(8), 2766-2770.
- Paixão, T., C. Ferreira, A. Borges, D. Oliveira, A. Lage and R. Santos. 2006. Frequency of bovine *Nramp1* (*Slc11a1*) alleles in Holstein and Zebu breeds. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109(1-2), 37-42.
- Pazzola, M., M. Dettori, M. Atzeni, F. Balia and G. Vacca. 2010. Genetic diversity of *NRAMP1* 3'-UTR microsatellite in cattle breeds reared in Sardinia. *Italian Journal of Animal Science*, 8(2s), 126-128.
- Pruitt, K., G. Brown, S. Hiatt, F. Thibaud-Nissen, A. Astashyn, O. Ermolaeva, C. Farrell, J. Hart, M. Landrum, K. Mcgarvey, M. Murphy, N. O'Leary, S. Pujar, B. Rajput, S. Rangwala, L. Riddick, A. Shkeda, H. Sun, P. Tamez, R. Tully, C. Wallin, D. Webb, J. Weber, W. Wu, M. Dicuccio, P. Kitts, D. Maglott, T. Murphy and J. Ostell. 2013. RefSeq: an update on mammalian reference sequences. *Nucleic acids research*. 42: D756-D763. Available on line: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24259432>. [Ene. 01, 2014].

- Sherry, S., M. Ward, M. Kholodov, J. Baker, L. Phan, E. Smigielski and K. Sirotkin. 2001. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research*, 29(1):308-311.
- Sunnucks, P., A. Wilson, L. Beheregaray, K. Zenger, J. French and A. Taylor. 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, 9(11), 1699–1710.
- Teschauer, W., T. Mussack, A. Braun, H. Waldner, and E. Fink. 1996. Conditions for single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis with broad applicability: a study on the effects of acrylamide, buffer and glycerol concentrations in SSCP analysis of exons of the p53 gene). *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry: journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, 34(2), 125-131.
- Walker, J., y R. Rapley. 2008. *Molecular biomethods handbook* (2nd ed ed.). Totowa, NJ: Humana Press.
- Vásquez, B., A. Márques, G. Seijas, O. De La Rosa y J. Aranguren, J. 2014. Detección de polimorfismos en la región codificante del gen receptor de hormona luteinizante mediante análisis de polimorfismo conformacional de cadena simple y secuenciación en bovinos Carora. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXIV, N° 5, 428 - 435, 2014*
- Vignal, A., D. Milan, M. San Cristobal, and A. Eggen. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetic Selection Evol.* 34: 275-305.
- Yang, W. K. Tang, S. Li and L. Yang. 2011. Association analysis between variants in bovine progesterone receptor gene and superovulation traits in Chinese Holstein cows. *Reproduction in domestic animals*, 46(6), 1029-1034.
- Yu, Y., Y. Pang, H. Zhao, X. Xu, Z. Wu, L. An and J. Tian. 2012. Association of a missense mutation in the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) with superovulation traits in Chinese Holstein heifers. *Journal of animal science and biotechnology*, 3(1), 35.