

Identificación de un polimorfismo del gen PAPP-A2 asociado a la fertilidad en vaquillas Romosinuano criadas en subtrópico

Identification of one polymorphism from the PAPP-A2 gene associated to fertility in Romosinuano beef heifers raised under a subtropical environment

Pablo Luna-Nevárez^a, Gonzalo Rincón^b, Juan F. Medrano^b, David G. Riley^c, Chad C. Chase Jr.^d, Sam W. Coleman^d, Kasey L. DeAtley^e, A. Islas-Trejo^b, Gail A. Silver^e, Milton G. Thomas^e

RESUMEN

El objetivo fue identificar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) asociados a la fertilidad en hembras bovinas criadas en subtropico. La re-secuenciación de nueve genes relacionados al eje endocrino GH-IGF, localizados en los cromosomas 5, 16 y 20 del bovino, identificó 73 SNP útiles para estudios genéticos asociativos; sin embargo, sólo siete resultaron polimórficos y exclusivos de la raza Romosinuano. Muestras de ADN se extrajeron de 129 vaquillas Romosinuano y usadas para determinar los genotipos correspondientes a cada SNP. Un análisis de modelos mixtos identificó únicamente a un polimorfismo del gen PAPP-A2 (C/T, rs110490898) como predictor ($P < 0.05$) del comportamiento reproductivo. El alelo T fue el más favorable ($P < 0.05$) ya que éste se asoció a una reducción tanto en la edad al primer parto (-37.1 ± 14.4 días), como en la edad al segundo parto (-65.43 ± 30.8 días). En el análisis de contrastes el término lineal resultó significativo ($P < 0.05$), pero no el cuadrático, lo cual sugiere un efecto aditivo de los alelos. Los resultados proporcionan evidencia para proponer al gen PAPP-A2, como candidato asociado al comportamiento reproductivo en vaquillas y vacas primerizas de la raza Romosinuano.

PALABRAS CLAVE: Comportamiento reproductivo, PAPP-A2, SNP, Romosinuano.

ABSTRACT

The objective was to identify single nucleotide polymorphisms (SNP) associated to fertility in cows raised under a subtropical environment. Re-sequencing of nine genes associated to GH-IGF endocrine pathway, which are located in bovine chromosomes 5, 16 and 20, identified 73 SNP useful for associative genetic studies; however, only seven resulted as polymorphic and unique to the Romosinuano breed. Then, DNA samples were extracted from 129 beef heifers and used to determine genotypes corresponding to each SNP. Mixed model analysis identified one SNP from the PAPP-A2 gene (C/T, rs110490898) as predictor ($P < 0.05$) of reproductive performance. The allele T was the most favorable allele ($P < 0.05$), because it was associated with lower age at first calving (-37.1 ± 14.4 d) and age at second calving (-65.43 ± 30.8 d). In the contrast analysis, the linear term resulted as significant and quadratic term as non significant, which suggested an additive effect of the alleles. These results provide evidence to support the PAPP-A2 gene as a candidate gene associated to reproductive performance in heifers and first-calf cows from the Romosinuano breed, raised under a subtropical environment.

KEY WORDS: PAPP-A2, Reproductive performance, Romosinuano, SNP.

Recibido el 24 mayo 2010 Aceptado el 17 octubre 2011.

^a Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Instituto Tecnológico de Sonora 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México. pluna@itson.mx

^b Departamento de Ciencia Animal, Universidad de California, Davis.

^c Departamento de Ciencia Animal, Universidad de Texas A&M, College Station, TX.

^d USDA-ARS, Estación de Investigación en Agricultura Subtropical, Brooksville, FL.

^e Departamento de Ciencias Animal y Pecuaria, Universidad Estatal de Nuevo México.

El apoyo financiero fue proporcionado por "USDA-Cooperative State Research, Education, and Extension Service-National Research Initiative (Washington, DC)", proyectos 2005-35205-15453 a JFM, y 2006-35205-1661 y 2008-35205-18751 a MGT.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción de ganado bovino para carne que se desarrollan en Estados Unidos en ambientes subtropicales, se caracterizan por un clima húmedo y caluroso. Para favorecer la adaptación del ganado y mantener una productividad aceptable, es común usar cruces *Bos taurus* X *Bos indicus* para aprovechar el vigor híbrido, aún cuando su rendimiento no supera al *B. taurus* europeo. Sin embargo, existen razas de ganado *B. taurus* con adaptabilidad demostrada a climas subtropicales⁽¹⁾; una de estas razas Criollas de ganado es la Romosinuano, originaria de Colombia, la cual se ha destacado por su alta fertilidad, longevidad, docilidad, temperamento y habilidad combinatoria con razas *B. indicus*⁽²⁾. Al respecto, Hernández-Cerón *et al.*⁽³⁾ reportaron una mayor resistencia a temperaturas elevadas de embriones Brahman y Romosinuano, en comparación con embriones Angus.

Por su tolerancia a climas con temperaturas elevadas, la raza Romosinuano contiene una estructura genética de gran interés para ser explotada en regiones subtropicales por medio de programas de selección genética. Actualmente, la "Estación de Investigación Agrícola Subtropical (STAR)" en Brooksville FL., cuenta con una población de vaquillas de la raza Romosinuano, las cuales son descendientes (en muchos casos progenie) de toros y vacas que fueron importados de Colombia y Venezuela, con la finalidad de estudiar su habilidad genética para adaptarse y producir eficientemente en climas subtropicales, tal y como lo describe Riley *et al.*⁽⁴⁾.

Los sistemas tradicionales para el mejoramiento genético incluyen la selección de padres con caracteres fenotípicos deseables que puedan ser transmitidos a la descendencia. Este procedimiento, aunque es bastante confiable, requiere de estudios generacionales por medio de pruebas de progenie para la construcción de índices genéticos (ej. EPD's). Con tecnologías moleculares, la información genómica está siendo generada en forma rápida y a gran escala en el ganado bovino, la cual puede ser combinada con información fenotípica para mejorar la precisión y confiabilidad de los

INTRODUCTION

Beef cattle production systems that are developing in United States under subtropical environments are characterized by a humid and warm weather. In order to favor adaptation of cattle and maintain an adequate productivity, *Bos taurus* X *Bos indicus* crosses are used commonly to take advantage of the hybrid vigor, albeit their performance is not superior than European *B. taurus*. However, there exist breeds of *B. taurus* cattle adapted to subtropical environments⁽¹⁾. One of these Criollo breeds is Romosinuano cattle, native from Colombia, which has been distinguished because its high fertility, longevity, docility, temperament and combinatorial ability with *B. indicus* breeds⁽²⁾. Hernández-Cerón *et al.*⁽³⁾ reported a better resistance to high temperatures in Brahman and Romosinuano embryos compared to Angus embryos.

Because their tolerance to high temperatures, the Romosinuano breed has a suitable genetic structure to be exploited in subtropical regions using programs of genetic selection. Currently, the Subtropical Agricultural Research Station (USDA-ARS) in Brooksville FL. has a heifer population of the Romosinuano breed descendent from bulls and cows imported from Colombia and Venezuela (in more cases progeny). This population has been used to study their genetic ability to adapt and produce efficiently under subtropical environments as described by Riley *et al.*⁽⁴⁾.

Traditional systems for genetic improvement involve selection of parents with favorable phenotypic traits that are able to be transmitted to their progeny. Although this procedure is rather reliable, it requires generational studies through progeny tests to develop genetic indexes (i.e. EPD). Using molecular technologies, genomic information is now being generated fast and a great scale in bovine cattle, which could be combined with phenotypic data to increase accuracy and reliability in systems of genetic evaluation^(5,6). Advances in discovering the genomic sequence of DNA from domestic animals, as well as identification of millions of molecular markers, have led to increase the animal genetic improvement. One approach of molecular technologies has been to identify candidate genes

sistemas de evaluación genética^(5,6). Los avances recientes en el descubrimiento de la secuencia genómica del ADN de las especies domésticas, así como la identificación de una gran cantidad de marcadores moleculares, han permitido incrementar y agilizar el mejoramiento genético animal⁽⁷⁾.

Uno de los enfoques de las tecnologías moleculares ha sido la identificación de genes candidatos y variantes moleculares de los mismos, que se caracterizan por su habilidad para influir en la expresión de caracteres fenotípicos complejos a los que se asocian funcionalmente, o por su cercana localización a una región genómica asociada a dichos caracteres⁽⁸⁾. Una gran ventaja de las tecnologías moleculares, es la posibilidad de mejorar la selección para caracteres fenotípicos difíciles de evaluar por los métodos tradicionales de mejoramiento, tal y como lo son los caracteres reproductivos, de longevidad y de características de la canal⁽⁹⁾.

Variaciones en la secuencia del gen del Factor de Crecimiento Insulínico Tipo 1 (IGF-1) están asociadas a las concentraciones sanguíneas del IGF-1 y a caracteres reproductivos y de crecimiento en la hembra bovina. Por lo tanto, se ha postulado al gen del IGF-1 como un gen candidato que puede ser utilizado en programas de selección genética para mejorar la fertilidad. Shirley *et al*⁽¹⁰⁾ encontraron un marcador molecular del gen del IGF-1 asociado a la fertilidad en vaquillas Brangus sometidas a un programa de sincronización de estros. Adicionalmente, Luna-Nevarez *et al*⁽¹¹⁾ reportaron asociaciones significativas entre variantes moleculares de genes relacionados al IGF-1 y caracteres reproductivos en vaquillas de estructura genética di-alélica (Angus x Brahman x Romosinuano). Se ha reportado que el IGF-1 juega un papel importante en la fisiología de procesos reproductivos como foliculogénesis, esteroidogénesis y desarrollo embrionario^(12,13).

Estudios recientes han corroborado la existencia de una región cromosómica dentro del cromosoma 5 que está asociada con ovulación y gestación gemelar, y que es regulada por el gen del IGF-1 y otros genes asociados a éste^(14,15). Dichos genes han sido descritos en el diagrama GenMapp descrito por Farber *et al*⁽¹⁶⁾, el cual incluye además del

and their molecular variants because of their ability to influence expression of complex phenotypic traits to which they are associated. An important advantage of molecular technologies is to improve the selection for phenotypic traits hard to evaluate using traditional methods for animal breeding. Some examples are reproductive, longevity and carcass traits⁽⁹⁾.

Molecular variants of the Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1) gene are associated to blood levels of IGF1, as well as reproductive and growth traits in female cows. Then, the IGF1 gene has been proposed as candidate gene for being used in programs for genetic selection to improve fertility. Shirley *et al*⁽¹⁰⁾ found a molecular marker of the IGF1 gene associated to fertility in Brangus heifers under an estrus synchronization program. In addition, Luna-Nevarez *et al*⁽¹¹⁾ reported significant associations between molecular markers associated to IGF1 gene and reproductive traits in heifers with a diallel genetic structure (Angus x Brahman x Romosinuano). It has been reported that IGF1 gene plays an important role in reproductive processes such as folliculogenesis, steroidogenesis and embryo development.

Recent studies have confirmed that a chromosomal region there exists within chromosome 5, which is associated to ovulation and double gestation, and it is regulated by IGF1 gene and related genes^(14,15). These genes have been described on the GenMapp diagram of Farber *et al*⁽¹⁶⁾, which includes IGF1 and other genes such as Growth Hormone Receptor (GHR), Insulin-like Growth Factor Binding Protein (IGFBP), Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT), and Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS). From the physiological standpoint, Growth Hormone (GH) stimulates hepatic synthesis of IGF1. The IGFBP is associated to IGF1 through a complex system of six proteins that regulates IGF1 bioavailability⁽¹⁷⁾. Likewise, STAT is a complex system of seven proteins that promotes activation of enzymatic processes required for IGF1 synthesis⁽¹⁸⁾. On the other hand, SOCS includes a family of six proteins but they are negatively associated to IGF1 as they inhibit its secretion.

Then, objective of this research was to develop an associative study between polymorphisms from genes

IGF-1, el receptor de la hormona del crecimiento (GHR), la proteína de enlace del IGF (IGFBP), el transductor de señal y activador de transcripción (STAT) y el supresor de señal de las citoquinas (SOCS). Desde el punto de vista fisiológico, la hormona del crecimiento estimula la síntesis hepática del IGF-1. El IGFBP está asociado al IGF-1, ya que por medio de un sistema complejo integrado por seis proteínas, regula la bio-disponibilidad del IGF-1⁽¹⁷⁾. En forma similar, STAT es un sistema complejo integrado por siete proteínas que participan en la activación de procesos enzimáticos requeridos para la síntesis del IGF-1⁽¹⁸⁾. Por su parte, SOCS incluye una familia de ocho proteínas que se asocian negativamente al IGF-1, ya que inhiben su secreción⁽¹⁹⁾.

Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue desarrollar un estudio asociativo entre polimorfismos de genes asociados al eje endócrino de la hormona del crecimiento y del Factor de Crecimiento Insulínico (GH-IGF), con el comportamiento reproductivo de vaquillas productoras de carne de la raza Romosinuano, criadas y desarrolladas en un ambiente subtropical.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población experimental y fenotipos evaluados

El presente estudio incluyó 129 vaquillas de raza pura Romosinuano, caracterizadas por su reconocida adaptabilidad y termo-tolerancia, nacidas en el periodo 2002-2005 y criadas en un sistema vacabecerro en la Estación de Investigación en Agricultura Subtropical (USDA-ARS) en Brooksville, Florida. Estas hembras formaban parte de una población experimental integrada por 650 vaquillas de las razas Angus (A), Brahman (B) y Romosinuano (R), así como sus cruza recíprocas (AxB, BxA, AxR, RxA, BxR y RxB). Luna-Nevarez *et al.*⁽¹¹⁾ reportaron previamente un estudio genético asociativo en esta población que incluyó los nueve grupos raciales antes descritos, por lo que un análisis de estratificación poblacional fue adicionalmente requerido debido a la diversidad racial.

Las becerras fueron aretadas y pesadas al nacimiento, herradas y vacunadas a los 60 días, y

related to Growth Hormone and Insulin like Growth Factor (GH-IGF) axis, with reproductive performance of beef heifers from the Romosinuano breed, which were born and raised under a subtropical environment.

MATERIALS AND METHODS

Experimental population and phenotypes

This study included 129 adaptable and heat-tolerant beef heifers from the breed Romosinuano, which were born from 2002 to 2005 and raised in the Subtropical Agricultural Research Station (USDA-ARS) in Brooksville FL. These females belonged to an experimental population of 650 heifers from the breeds Angus (A), Brahman (B) and Romosinuano (R), and their reciprocal crosses (AxB, BxA, AxR, RxA, BxR and RxB). Luna-Nevarez *et al.*⁽¹¹⁾ reported an associative genetic analysis involving this population, which included a stratification analysis required for multi-breed populations.

Calves were tagged and weighed at birth, branded and vaccinated at 60 d, and weighed again at 205 and 365 d of age. Heifers were developed by grazing Bermuda and Bahia grass pastures; after weaning in September, heifers were placed with bulls and palpated for pregnancy the following September (e.g., one year later). Non-pregnant heifers remained grazing with bulls until they became pregnant. After calving, first-calf heifers were again exposed to bulls from March 20 to June 20, and then palpated for pregnancy diagnosis as described by Riley *et al.*⁽²⁰⁾.

Intervals from birth to first and second calving were registered for each heifer and reported as age at first calving (AFC) and age at second calving (ASC), respectively. Difference in days between AFC and ASC was reported as calving interval (CI). Similarly, calving date (CD) was determined as the difference in days between the second calving date and the first date of the last breeding season that heifers were exposed to bulls. Measures of birth weight, 205-d weight and 365-d weight were reported and adjusted by age of calf and age of dam according to Beef Improvement Federation Guidelines⁽²¹⁾.

pesadas de nuevo a los 205 (destete) y 365 días de edad. Como parte de su manejo, las vaquillas fueron mantenidas en pastoreo de zacates Bahía y Bermuda; fueron destetadas en septiembre, y desde entonces permanecieron con los toros hasta septiembre del siguiente año, cuando fueron palpadas para determinación de preñez. Las vaquillas diagnosticadas como no-preñadas, siguieron pastoreando junto con los toros hasta que resultaron gestantes. Después del parto, las vacas primerizas fueron expuestas de nuevo a los toros del 20 de marzo al 20 de junio, y posteriormente palpadas para diagnosticar preñez, así como lo describe Riley *et al*⁽²⁰⁾.

Los intervalos del nacimiento hasta el primer y segundo partos fueron registrados para cada vaquilla, y reportados como edad al primer parto (EPP) y edad al segundo parto (ESP), respectivamente. El intervalo entre partos (INT) fue calculado como la diferencia en días entre ESP y EPP. La variable días al parto (DP) fue determinada como la diferencia en días entre ESP y el primer día de la época de empadre previa en la que las vaquillas fueron expuestas a los toros. Los pesos obtenidos al nacimiento, 205 días y 365 días de edad se registraron y ajustaron por edad del becerro y edad de la madre, de acuerdo a la guía de la Beef Improvement Federation⁽²¹⁾.

Identificación de genes y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

El diagrama Gen MAPP elaborado por Farber *et al*⁽¹⁶⁾ incluye un total de 161 genes en 14 diferentes grupos fisiológicos, uno de los cuales es el eje funcional GH-IGF. En el presente estudio se incluyeron los siguientes genes: IGF-1, Molécula de Adhesión Celular dependiente de Glicosilación-1 (GLYCAM1), Proteína de Enlace del Factor de Crecimiento Insulínico-6 (IGFBP6), Supresor de Señal de Citoquinas-2 (SOCS2), Transductor de Señal y Activador de Transcripción-2,6 (STAT-2,-6) y Hormona Concentradora de Pro-Melanina (PMCH), los cuales fueron identificados en una región de 23 Mb dentro del cromosoma 5, por medio del diagrama GenMAPP. Los genes del GHR y de la Proteína Plasmática Asociada a la Preñez-A2 (PAPP-A2), que se localizan en los

Identification of genes and polymorphisms

The GenMAPP described by Farber *et al*⁽¹⁶⁾ includes 161 genes from 14 different physiological groups. The GH-IGF functional axis from a 23 Mb-region of bovine chromosome 5 was identified on this diagram. This region involves several genes included in this study such as IGF1, Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule 1 (GLYCAM1), Insulin-like Growth Factor Binding Protein 6 (IGFBP6), Suppressor of Cytokine Signaling 2 (SOCS2), Signal Transducers and Activators of Transcription 2 and 6 (STAT2, 6), and Pro-Melanin Concentrating Hormone (PMCH). Genes from Growth Hormone Receptor (GHR) of chromosome 16 and Pregnancy Associated Plasma Protein A2 (PAPP-A2) of chromosome 20, were also included in this study because of their important physiologic relationship to the GH-IGF axis. The *Ensembl* software (<http://www.ensembl.org/index.html>) was used to obtain molecular sequences from these genes. The *Vector NTI* software (Vector *NTI Advance*[™] Software for Gateway[®], Invitrogen, 2006) was used to visualize both molecular sequence and functional regions of these genes. Then, the *Vista Alignment* software (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>) was used to identify coding and noncoding regions from these genes, which were also conserved among domestic animals.

Functional regions of the genes were resequenced following the procedures described by Rincon *et al*⁽²³⁾, Garrett *et al*⁽²⁴⁾, Luna-Nevarez *et al*⁽¹¹⁾ and Wichramasinghe *et al*⁽²⁵⁾. In order to increase genetic diversity and improve resequencing, DNA was extracted using semen from 48 unrelated bulls: a dairy panel of 8 Holstein, 8 Brown Swiss and 8 Jersey, and a beef panel of 6 Black Angus, 6 Brahman, 6 Brangus and 6 Simmental. The PUREGENE kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN) was used to extract the DNA following the procedures described by Garrett *et al*⁽²⁴⁾. Resequencing was completed at SeqWright Lab (Houston Texas; ABI Prism[™] 3730xl DNA sequencers) using both molecular sequences in fasta format and functional regions of each gene under study. Functional regions were the most conserved exons, 1000 bp of the 5'-untranslated region, and 500 bp of the 3'-untranslated region. If a gene

cromosomas 16 y 20, respectivamente, fueron también estudiados debido a que están funcionalmente relacionados al eje endocrino GH-IGF. Las secuencias genómicas de dichos genes se obtuvieron utilizando el programa *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>). La estructura molecular de cada gen, así como sus respectivas regiones funcionales, fueron visualizadas con el programa *Vector NTI* (*Vector NTI Advance™ Software for Gateway®*, Invitrogen, 2006). Posteriormente, el programa *Vista Alignment* (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>) se utilizó para identificar las regiones reguladoras codificables y no-codificables de cada gen que se conservan entre las diferentes especies domésticas⁽²²⁾.

Para la re-secuenciación se siguieron los procedimientos descritos por Rincon *et al.*⁽²³⁾ para los genes IGF-1, IGFBP6, PMCH y STAT2, por Garrett *et al.*⁽²⁴⁾ para GHR, por Luna-Nevarez *et al.*⁽¹¹⁾ para GLYCAM1, SOCS2 y STAT6, y por Wichramasinghe *et al.*⁽²⁵⁾ para PAPP-A2. Inicialmente, se procedió a la extracción de ADN del semen de un grupo de 48 toros sin parentesco en al menos tres generaciones filiales. Con la finalidad de incrementar la diversidad genética y favorecer el proceso de re-secuenciación, dicho grupo estuvo integrado por seis toros productores de carne de cada una de las siguientes razas: Angus,

contained multiple exons (> 10), then *Vista Alignment* software was conducted again to identify most conserved exons. Specific primers for each gene were designed to run PCR reactions and generate the corresponding amplicons.

Amplicons resulting from resequencing were assembled to identify polymorphisms using the CodonCode software (CodonCode® Corporation, Dedham, MA). Algorithms Phred and Phrad were used to study resulting sequences and confirm polymorphisms. Then, they were tested to be synonymous or non-synonymous using Polyphen software (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>) and (or) if they were a tag SNP (Haploview; Barrett *et al.*, 2005). As result, a panel of 73 SNP was discovered. Polymorphism distribution according to gene and breed are depicted in Table 1. Whereas the 73 discovered SNP are listed in Table 2. In addition, 5 Tag SNP in the genes IGF1, PMCH y STAT2 were discovered. Tag polymorphisms are important pieces of genomic information suitable to identify haplotype blocks, which are helpful to design associative genetic studies with productive performance in bovine cattle.

Blood samples, DNA extraction and genotyping

Blood samples were collected from each heifer by jugular venipuncture using vacuum tubes coated with 4% EDTA (#VT 6457; VWR, Pittsburgh, PA).

Cuadro 1. Nombre del gen, número de polimorfismos secuenciados y razas en las que se identificaron

Table 1. Gene name, number of sequenced polymorphisms and breed groups

Gene name	Sequenced polimorphisms	Breed group
Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1)	7	A, B, Br, H, J, PS y S
Pro-Melanin Concentrating Hormone (PMCH)	5	A, B, Br, H, J, PS y S
Glycosylation-dependet Cell Adhesion Molecule 1 (GLYCAM1)	12	A, B, Br, H, J, PS y S
Insulin-like Growth Factor Binding Protein 6 (IGFBP6)	5	A, B, Br, H, J, PS y S
Pregnancy Associated Plasma Protein A2 (PAPP-A2)	10	H, J y PS
Growth Hormone Receptor (GHR)	1	A, Br, H, PS y S
Suppressor of Cytokine Signaling 2 (SOCS2)	10	A, B, Br, H, J, PS y S
Signal Transducer and Activator of Transcription 2 (STAT2)	8	A, B, Br, J, PS y S
Signal Transducer and Activator of Transcription 6 (STAT6)	15	A, B, Br, J, PS y S
Total	73	

A=Angus; B=Brahman; Br=Brangus; H=Holstein; J=Jersey; PS=Brown Swiss; S=Simental.

POLIMORFISMO DEL GEN PAPP-A2 EN VAQUILLAS ROMOSINUANO

Cuadro 2. Polimorfismos de cada gen resultantes de la re-secuenciación

Table 2. Polymorphisms from each sequenced gene

Gene abbreviation(Ensembl ID)	Chromosome	Alleles	Position within the gene	Type of mutation
IGF1 (ENSBTAG00000011082)	5	C/T	5'UTR	Noncoding
		C/T	5'UTR	Noncoding
		A/G	Intron 1	Noncoding
		A/C	Intron 3	Noncoding
		C/T	Intron 3	Noncoding
		G/T	Intron 4	Noncoding
		A/T	Intron 4	Noncoding
		C/T	5'UTR	Noncoding
		A/T	5'UTR	Noncoding
		A/C	Intron 2	Noncoding
PMCH (ENSBTAG00000013008)	5	C/T	5'UTR	Noncoding
		A/T	5'UTR	Noncoding
		T/G	Exon 1	Asp/Glu
		A/C	Intron 2	Noncoding
		C/T	3'UTR	Noncoding
GLYCAM1 (ENSBTAG00000013417)	5	A/G	5'UTR	Noncoding
		A/G	5'UTR	Noncoding
		C/T	Intron 2	Noncoding
		A/C	Exon 3	Sinónimo
		A/G	Intron 3	Noncoding
		A/G	Intron 3	Noncoding
		A/G	Intron 3	Noncoding
		A/T	Intron 3	Noncoding
		C/T	Intron 3	Noncoding
		C/G	Exon 4	Ala/Gly
		T/C	Exon 4	Synonymous
		A/C	Exon 4	Thr/Pro*
IGFBP6 (ENSBTAG00000021467)	5	C/T	Exon 1	Synonymous
		C/A	Exon 2	Pro/His*
		C/T	Exon 2	Synonymous
		A/G	Exon 2	Thr/Ala
		C/T	Exon 3	His/Tyr*
PAPPA2 (ENSBTAG00000018303)	20	A/G	5'UTR	Noncoding
		C/T	5'UTR	Noncoding
		C/T	Exon 2	Synonymous
		A/C	Exon 8	Ala/Glu
		A/T	Intron 10	Noncoding
		A/C	Intron 10	Noncoding
		G/T	Intron 10	Noncoding
		A/G	Exon 11	Gly/Asp
		A/G	Exon 12	Synonymous
		C/T	Intron 15	Noncoding
Gene Abbreviation(Ensembl ID)	Chromosome	Alleles	Position within the gene	Type of mutation
GHR (ENSBTAG0000001335)	16	A/G	5'UTR	Noncoding
SOCS2 (ENSBTAG00000012007)	5	A/G	5'UTR	Noncoding
		C/T	5'UTR	Noncoding
		G/T	5'UTR	Noncoding
		A/C	5'UTR	Noncoding
		G/A	Intron 2	Noncoding
		C/T	Intron 2	Noncoding
		C/T	Intron 2	Noncoding
		G/T	Exon 3	Noncoding
		C/T	Exon 3	Noncoding
		G/A	Exon 3	Noncoding
STAT2 (ENSBTAG00000004380)	5	C/T	5'UTR	Noncoding
		A/G	5'UTR	Noncoding
		A/C	5'UTR	Noncoding
		C/T	Intron 4	Noncoding
		T/C	Exon 5	Asp/Asp
		A/G	Intron 6	Noncoding
		C/T	Intron 6	Noncoding
		C/T	Exon 8	Ser/Phe*
STAT6 (ENSBTAG00000006335)	5	A/G	5'UTR	Noncoding
		C/T	5'UTR	Noncoding
		A/C	Intron 1	Noncoding
		C/G	Intron 1	Noncoding
		C/T	Intron 1	Noncoding
		A/C	Intron 1	Noncoding
		C/G	Intron 3	Noncoding
		C/T	Intron 4	Noncoding
		A/G	Intron 4	Noncoding
		A/G	Intron 8	Noncoding
		C/T	Exon 10	Synonymous
		A/C	Exon 15	Synonymous
		C/T	Intron 16	Noncoding
		C/T	Intron 20	Noncoding
		C/G	3'UTR	Noncoding

Ensembl= Software used to obtain genomic sequences.

5'UTR= 5'-untranslated region (noncoding).

3'UTR= 3'-untranslated region (noncoding)

Brahman, Brangus, Simmental; y ocho toros productores de leche de cada una de las siguientes razas: Holstein, Jersey y Pardo Suizo. El ADN fue extraído utilizando el kit PUREGENE (Gentra Systems, Minneapolis, MN) siguiendo los procedimientos descritos por Garrett *et al.*(24). La secuencia en formato fasta, así como las regiones funcionales de cada uno de los genes mencionados fueron enviadas al Laboratorio comercial SeqWright (Houston Texas; ABI Prism™ 3730xl DNA sequencers), en donde se diseñaron los iniciadores y se realizaron las reacciones de PCR requeridas para completar la re-secuenciación, y generar los amplicones correspondientes a cada gen. Dichas regiones funcionales incluyeron los exones más conservados entre especies, así como 1,000 pares de bases de la región no-codificada 5´ (5´UTR) y 500 pares de bases de la región no-codificada 3´ (3´UTR). Sólo si las secuencias génicas contenían más de 10 exones, el programa *Vista Alignment* se utilizó de nuevo para identificar los exones más conservados entre diferentes especies.

Los amplicones de cada gen (en forma de secuencia) que resultaron de la re-secuenciación de cada uno de los 48 toros, fueron ensamblados para la detección de los polimorfismos usando el software CodonCode® (CodonCode® Corporation, Dedham, MA). Los algoritmos Phred y Phrap de este software fueron utilizados para la interpretación de las secuencias resultantes del ensamblaje, y la posterior identificación de los polimorfismos. El software Polyphen fue utilizado para determinar si los polimorfismos eran sinónimos o no-sinónimos (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>), mientras que el programa Haploview(26) identificó si existían polimorfismos marcadores. Como resultado de estas aplicaciones, se generó un panel que contenía un total de 73 polimorfismos de nucleótido simple. La distribución de los polimorfismos por gen y por raza, así como el listado de los 73 polimorfismos y su descripción, se muestran en los Cuadros 1 y 2, respectivamente. Además, se detectaron en promedio cinco polimorfismos marcadores en los genes IGF1, PMCH y STAT2, lo que facilitará la búsqueda de bloques de haplotipos, que son piezas informativas importantes para el diseño de estudios genéticos asociativos con el comportamiento productivo del ganado.

Samples were centrifuged at 2,500 $\times g$ for 25 min at 37 °C until a white blood cell supernatant (e.g., buffy coat), a clear and liquid supernatant (e.g., blood serum), and a dark precipitated appeared in the tube. Then, buffy coat was collected and processed to extract and measure DNA concentration.

Flexigene, a commercial DNA blood mini kit (No. 51297, Qiagen, Valencia, CA), was used to extract DNA from 200 μ l of buffy coat. Quantification of DNA was performed using the Beckman UV/VIS spectrophotometer (Spectro DU® 640, Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA) and a 96-well microtiter plate reader (MRX-HD, Dynex technologies, Chantilly, VA, USA). Genomic DNA was aliquoted by duplicated and stored in 1.5 ml tubes at -80 °C until assayed for molecular analyses.

Genotyping was performed using 25 ng/ μ l of DNA (i.e., 25 ng/ μ l in Tris-EDTA buffer) from each heifer. Then, amplicons derived from PCR and the Sequenom MassArray platform (Neogen/GeneSeek, Inc., Lincoln, NE) were used to determine genotypes from each polymorphism following the allelic discrimination procedure. Genotyping was completed using several multiplex SNP assays including an initial locus-specific PCR reaction, followed by a single base extension using an oligonucleotide primer which anneals immediately upstream of the polymorphic site of interest. The primer extension is a single complementary mass-modified base elaborated according to the sequence of the variant site. After, both primer and amplified target DNA are incubated with mass-modified dideoxynucleotide terminators. Finally, the mass of the extended primer is determined through MALDI-TOF mass spectrometry to identify the primer sequence and the alleles located at the polymorphic site under study. Sequenom technology uses SpectroTYPER software to translate the mass of the observed primers into a genotype for each reaction(27).

Statistical analyses

Analyses were conducted using SAS software (Version 9.2; SAS Inst. Inc., Cary, NC), which included Genetic Analysis Tools of SAS(28).

Muestras sanguíneas, extracción de ADN y genotipificación

Para la recolección de muestras de sangre, se utilizaron tubos vacutainer con anticoagulante EDTA (4%) vía vena yugular; posteriormente fueron centrifugadas a 2,500 rpm durante 25 min a temperatura ambiente (37 °C), hasta la aparición de un sobrenadante (suero sanguíneo), una capa blanquecina intermedia (capa leucocitaria) y un precipitado oscuro (eritrocitos). Posteriormente, las muestras fueron procesadas para la extracción y cuantificación de la concentración de ADN.

El kit comercial Flexigene (No. 51297, Qiagen, Valencia, CA) se utilizó para la extracción de ADN a partir de 200 µl de capa leucocitaria. El ADN de cada muestra se cuantificó utilizando una micro placa lectora de 96 discos (MRX-HD, Dynex technologies, Chantilly, VA, USA) y un espectrofotómetro Beckman UV/VIS (Spectro DU® 640, Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA). Una vez cuantificado, el ADN se dividió en dos alícuotas y se colocó en dos tubos para su almacenamiento a -80 °C hasta su utilización para análisis genéticos.

Los derivados del PCR obtenidos como producto de la re-secuenciación (amplicones), al igual que las muestras de ADN obtenidas (25 ng/µl disueltos en buffer Tris-EDTA), se enviaron al laboratorio Neogen/GeneSeek, Inc. (Lincoln, NE) para la determinación por discriminación alélica de los genotipos correspondientes a cada polimorfismo, por medio de la plataforma comercial "Sequenom MassArray". Este ensayo consistió en una reacción inicial de PCR específica por locus, seguida por una reacción de extensión de una base sencilla, en la cual un iniciador oligonucleótido específico se fija inmediatamente en la parte superior del sitio polimórfico de interés. El iniciador para la extensión es elaborado de acuerdo a la secuencia del sitio al que se va a fijar, y consiste en una base complementaria con masa modificada. En la segunda reacción, el iniciador y el segmento específico de ADN que ha sido amplificado, son incubados con finalizadores dideoxinucleótidos con masa modificada. Finalmente, con espectrometría de masas MALDI-TOF se determina la masa distintiva del iniciador, la cual indica la secuencia y los alelos

Simple descriptive statistics for continuous traits (i.e., AFC, DC, CI and ASC) were calculated using PROC MEANS. Assumptions of normality of data distribution and equality of variances were tested using PROC UNIVARIATE⁽²⁹⁾. Allele and genotype frequencies, as well as deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, were estimated with PROC ALLELE⁽²⁸⁾. Genotype to phenotype association analyses were conducted using PROC MIXED for continuous traits. Only polymorphisms with minor allele frequency greater than 10% (e.g., MAF > 0.10) were considered appropriate to be included in association analyses. The statistical model included fixed effects of SNP genotype, year of birth (i.e., 2002, 2003, 2004, and 2005), and age of dam (i.e., 2, 3, 4, 5 to 10, or 11 yr and older), random effect of the sire (i.e., using Z statistic to test if $H_0: \sigma_w^2 = 0$) and residual effect (mean = zero, variance = σ_e^2).

When genotype term was found to be a significant source of variation ($P < 0.05$) in association analyses for continuous traits, preplanned pairwise comparisons of least squares means were generated with PDIFF option. These mean separation tests were executed using LSMEANS in the mixed procedure, which included Bonferroni adjustment⁽³⁰⁾. Effect of the average allele

Cuadro 3. Valores promedio ± EE para caracteres productivos y reproductivos en vaquillas de la raza Romosinuano

Table 3. Mean values ± SE for productive and reproductive traits in Romosinuano beef heifers

Trait	N	Mean ± SE
Birth weight, kg	129	29.7 ± 0.2
Weaning weight, kg	129	176.7 ± 1.8
Yearling weight, kg	129	222.4 ± 2.5
Age at first calving, d	129	774.4 ± 7.2
Pregnancy rate at 2-yr old, %	129	53.5
Pregnancy rate in heifers, %	112	89.9
Days to calving, d	112	389.8 ± 15.4
Calving interval, d	112	433.3 ± 13.8
Age at second calving, d	112	1204.1 ± 17.6

que están presentes en el sitio polimórfico que está siendo estudiado. Esta última fase de la plataforma "Sequenom MassArray" utiliza el software SpectroTYPER, el cual automáticamente traduce la masa del iniciador específico en el genotipo correspondiente a cada reacción⁽²⁷⁾.

Análisis estadístico

Los análisis fueron realizados utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.2 (SAS Inst. Inc., Cary, NC), que incluye las herramientas de análisis genéticos⁽²⁸⁾.

Las estadísticas descriptivas para las variables continuas estudiadas (EPP, DP, INT y ESP) se calcularon utilizando el procedimiento MEANS. La asunción de normalidad e igualdad de varianzas fueron probadas con el procedimiento UNIVARIATE⁽²⁹⁾. Las frecuencias alélicas y genotípicas, así como la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg, se estimaron usando el procedimiento ALLELE⁽²⁸⁾.

substitution (e.g., effect of substituting 1 allele in the population with another allele) was also calculated using a regression model that included genotype term as covariate⁽³¹⁾. Additive and dominance (e.g., non-additive) genetic effects were estimated following the procedures described by Sherman *et al*⁽³²⁾. Linear and quadratic contrasts were also executed to confirm or negate an additive or dominance allele effect.

RESULTS

Descriptive statistics for growth and reproductive traits in Romosinuano beef heifers are reported in Table 3. In this population, only 7 of the 73 discovered SNP had minor allele frequency greater than 10 %. Therefore, only these molecular markers were included in this study as they are considered as polymorphic and unique to the Romosinuano breed. Allelic and genotypic frequencies of these polymorphisms, as well as their NCBI ID and ubication within the gene, are depicted in Table 4. According to Balding⁽³³⁾, only SNP with minor

Cuadro 4. Frecuencia alélicas y genotípicas de los 7 polimorfismo del gen PAPP- A2 en vaquillas y vacas primerizas de la raza Romosinuano (FAM >0.10)

Table 4. PAPP-A2 allele and genotype frequency percentages in Romosinuano heifers and first-calf cows (MAF > 0.10)

Gene	Polymorphism ID	Position	Allele frequencies (%)		Genotype frequencies (%)		
			A	G	AA	AG	GG
GHR	rs109203152	5'UTR ⁶	62	38	38	47	15
IGFBP6	rs136497026	Exon 2	A	C	AA	AC	CC
			30	70	9	42	49
GLYCAM1	rs136723762	Exon 4	C	G	CC	CG	GG
			72	28	52	40	8
GLYCAM1	rs137120588	Intron 3	A	T	AA	AT	TT
			31	69	10	43	47
PAPP-A2	rs110490898	Exon 2	C	T	CC	CT	TT
			83	17	68	30	2
PAPP-A2	rs108940238	Exon 2	C	T	CC	CT	TT
			85	15	72	26	22
PMCH	rs135033882	5'UTR ⁶	A	T	AA	AT	TT
			35	65	12	46	42

GHR= Growth hormone receptor; IGFBP6= Insulin-like growth factor binding protein 6; GLYCAM1= Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1; PAPP-A2= Pregnancy associated plasma protein A2; PMCH= Pro-Melanin concentrating hormone; 5'UTR= 5'-untranslated region (noncoding).

El análisis asociativo entre genotipo y fenotipo se desarrolló usando el procedimiento MIXED para variables continuas, y sólo los polimorfismos con frecuencia del alelo menor superior al 10 % (FAM > 0.10) fueron considerados. El modelo estadístico incluyó los efectos fijos del genotipo del polimorfismo (ej. CC, CT y TT), año de nacimiento (ej. 2002, 2003, 2004 y 2005) y edad de la madre (ej. 2, 3, 4, 5 a 10, ó 11 en adelante), el efecto aleatorio del semental (ej. usando la estadística Z para probar si $H_0: \sigma_w^2=0$) y el efecto residual (media=cero, varianza= σ_e^2).

Cuando el término genotipo resultó ser fuente significativa de variación ($P < 0.05$) en el análisis asociativo para variables continuas, se utilizó la opción PDIFF del procedimiento LSMEANS para generar las comparaciones entre medias para cada genotipo, incluyendo el ajuste Bonferroni⁽³⁰⁾. El efecto de la sustitución alélica (ej. efecto de substituir un alelo por otro dentro de la población) se calculó con un modelo de regresión incluyendo el término genotipo como covariable⁽³¹⁾. Los efectos genéticos de dominancia y aditividad se estimaron siguiendo los procedimientos descritos por Sherman *et al*⁽³²⁾. Un análisis de contrastes (ej. lineal y cuadrático) se desarrolló para confirmar si el efecto individual de los alelos correspondientes a los genes en estudio fue dominante o aditivo.

allele frequency from 5 to 10 % must be included in order to avoid spurious associations between genotype and phenotype.

From the seven polymorphisms included in this study, mixed model analyses identified only a SNP from the PAPP-A2 gene (C/T, rs110490898) as significant predictor ($P < 0.05$) of the reproductive traits age at first calving and age at second calving. Fixed effect of year of birth and random effect of sire were significant sources of variation in prediction of reproductive traits ($P < 0.01$). Least square means for reproductive phenotypic traits among genotypes from the PAPP-A2 SNP are reported in Table 5.

An allele substitution effect was detected ($P < 0.05$) and the allele T appeared to be the most favorable, because it reduced both age at first calving (-37.1 ± 14.4 d) and age at second calving (-65.43 ± 30.8 d) as indicated in Table 6. In the contrast analyses linear effect was significant, but not quadratic, which suggest an additive effect of the alleles.

DISCUSSION

The PAPP2 gene is associated to GH-IGF endocrine axis because it transcribes a metalloproteinase which causes a degradation of IGF binding proteins, specifically IGFBP5, allowing

Cuadro 5. Medias de cuadrados mínimos ± EE para caracteres de fertilidad entre los genotipos de un polimorfismo del gen PAPP-A2

Table 5. Least square means ± SE for fertility traits among genotypes from a PAPP-A2 polymorphism

Trait	N	Polymorphism rs110490898			P-value
		CC ^c	CT ^d	TT ^c	
AFC	129	791.2 ± 10.5 ^a	752.3 ± 13.8 ^b	734.3 ± 61.8 ^b	0.0433
DC	112	385.2 ± 19.3	398.4 ± 26.5	337.0 ± 88.6	0.6246
INT	112	441.0 ± 19.0	425.1 ± 24.5	361.0 ± 80.2	0.2951
ASC	112	1230.3 ± 24.8 ^a	1176.1 ± 30.7 ^b	1113.0 ± 99.8 ^b	0.0446

AFC= age at first calving; DC= days to calving; INT= calving interval; ASC= age at second calving.

^c Homozygote genotypes.

^d Heterozygote genotype.

^{a,b} Within a row, means without a common superscript differ ($P < 0.05$)

RESULTADOS

Las estadísticas descriptivas para los caracteres de crecimiento y reproductivos se muestran en el Cuadro 3. Sólo 7 polimorfismos de los 73 incluidos en el panel antes descrito mostraron una FAM > 0.10 en estas hembras. Por lo tanto, dichos marcadores moleculares se consideran polimórficos y exclusivos únicamente de la raza Romosinuano, por lo cual sólo ellos fueron incluidos en la presente investigación. Las frecuencias alélicas y genotípicas de estos 7 polimorfismos, así como su registro y localización, se describen en el Cuadro 4. De acuerdo con Balding⁽³³⁾, la frecuencia del alelo menor debe ser al menos 5 o 10 % para evitar resultados falsos en un estudio asociativo entre genotipo y fenotipo.

El análisis asociativo, por medio de un modelo de efectos mixtos, indicó que de los 7 polimorfismos identificados como exclusivos de la raza Romosinuano en el presente estudio, sólo uno, localizado en el gen PAPP-A2 (C/T, rs110490898), mostró un efecto significativo como predictor sobre los caracteres reproductivos de edad a primer parto y edad a segundo parto ($P < 0.05$). Al analizar el efecto fijo del año de nacimiento y el efecto aleatorio del padre, ambos resultaron ser fuentes significativas de variación sobre las variables reproductivas mencionadas ($P < 0.01$). El Cuadro 5 describe las

IGF-1 to be available to regulate multiple physiological functions related to reproduction^(34,35,36). According to novel reports, both PAPP2 and IGFBP5 genes have been proposed to be involved in the regulation of placental and fetal growth through the IGF pathway⁽³⁷⁾. Moreover, proteolysis of IGFBP5 caused by PAPP2 could inhibit cytotrophoblast invasion to facilitate embryo implantation and maintenance⁽³⁸⁾. In a previous study, Luna-Nevarez *et al.*⁽¹¹⁾ reported three molecular markers as polymorphic in developing heifers ($n = 650$) from a population composed of Angus, Brahman, and Romosinuano breeds, and their reciprocal crosses. These SNP were in the genes of PAPP-A2 (rs42301961-A/C and rs42301978-G/T) and STAT2 (rs137066603-A/G). Only polymorphisms from PAPP-A2 gene influenced ($P < 0.05$) traits indicative of 1st-calf heifer rebreeding (i.e., calving interval, days to calving, and pregnancy rate), although they did not predict traits related to heifer fertility. Both PAPP2 markers were tag SNP localized within intron 10^(23,25), a non-functional region of the gene. Although splicing or removal of introns occurs during transcription, an intron involving a regulatory sequence can be retained in the mRNA transcript in a process called alternative splicing. Also, PAPP-A2 SNP could be in linkage disequilibrium to other functional SNP within the same gene. These results suggest that PAPP-A2 gene is associated to fertility traits in beef heifers and cows. In another study, Wichramasinghe *et al.*⁽²⁵⁾

Cuadro 6. Efectos de sustitución alélica y efectos fijos de aditividad y dominancia para los genotipos favorables del polimorfismo del gen PAPP-A2 (rs110490898)

Table 6. Allele substitution estimates and fixed effect estimates of additive and dominance of favorable PAPP-A2 polymorphism (rs110490898) genotypes

Trait	Allele substitution effects			Fixed effects		
	P-value ^a	Estimate ^b	SE	P-value ^c	Additive effect ^d	Dominant effect ^e
AFC	0.0126	-37.1	14.4	0.0458	28.5	10.4
ASC	0.0386	-65.4	30.8	0.0584	58.6	4.4

AFC= age at first calving; ASC= age at second calving.

^a P-values obtained from allele substitution analysis in SAS which included the term genotype as covariate.

^b Estimates of the effect expressed in units of the traits.

^c P-values for fixed effects obtained from substitution of favorable allele analysis which included the genotype term as fixed effect.

^d Additive effect estimated as the difference between the 2 homozygous means divided by 2.

^e Dominant effect calculated as the deviation of the heterozygous from the mean of the 2 homozygous.

medias de cuadrados mínimos de los caracteres reproductivos correspondientes a cada uno de los genotipos del polimorfismo del gen PAPP-A2 identificado como predictor, donde el alelo T resultó ser el alelo favorable ($P < 0.05$).

Tal y como se describe en el Cuadro 6, cuando el alelo T está presente en el genotipo, se reduce tanto la edad al primer parto (-37.1 ± 14.4 días) como la edad al segundo parto (-65.43 ± 30.8 días), lo cual indica un efecto de sustitución alélica ($P < 0.05$). En el análisis de contrastes el término lineal resultó significativo ($P < 0.05$), pero no el cuadrático, lo cual sugiere un efecto aditivo de los alelos.

DISCUSIÓN

Como se describió, el gen PAPP-A2 está asociado al eje endocrino GH-IGF, debido a que este gen transcribe una metalo-proteinasas que degrada a la proteína de enlace del IGF-5 (IGFBP-5), facilitando la liberación del IGF-1, quien se encarga de regular múltiples funciones relacionadas a la reproducción^(34,35,36). Reportes recientes han propuesto que ambos genes, PAPP-A2 e IGFBP5, están asociados al crecimiento placentario y fetal por medio de su efecto sobre el IGF-1⁽³⁷⁾. Además, el efecto proteolítico causado por el PAPP-A2 sobre el IGFBP5 podría inhibir la invasión al citotrofoblasto embrionario, lo cual facilitaría la implantación y mantenimiento del embrión⁽³⁸⁾. Luna-Nevarez *et al*⁽¹¹⁾ reportaron previamente tres marcadores moleculares, dos en el gen PAPP-A2 (rs42301978 y rs42301961), y uno en el gen STAT2 (rs137066603), como polimórficos entre una población de 650 vaquillas Angus, Brahman y Romosinuano, así como sus cruza recíprocas. De estos marcadores, sólo los dos identificados en el gen PAPP-A2 se asociaron en forma significativa al comportamiento reproductivo en vacas de primer parto (ej. intervalo entre partos, días al parto y tasa de preñez), aunque estos polimorfismos no resultaron ser predictores de la fertilidad en vaquillas. Ambos polimorfismos se localizaron en el intrón 10^(23,25), que es una región no funcional del gen PAPP-A2, pero debido a su posible cercanía con una región funcional, este intrón podría quedar retenido, y entonces transcribirse dentro de la cadena

reported three polymorphisms from the PAPP-A2 gene (rs109259828, rs109952914 and rs42301961) associated to productive (i.e. productive life, milk yield and protein yield) and reproductive traits (i.e. pregnancy rate and daughter calving easy) in dairy Holstein cows. These SNP were 1 non-synonymous and 2 non-coding (e.g., intron 10); however, they were in strong linkage disequilibrium across functional regions of the PAPP-A2 gene (e.g., exons 10 and 11) that transcribe to mRNA. These results suggest an important role of the PAPP-A2 gene to influence both fertility and milk production improvement in Holstein cattle, through a positive effect on bone pelvic development and mitosis of mammary epithelial cells, respectively.

The PAPP-A2 gene is localized in chromosome 16, and it contains 443,513 bp and 22 exons. The SNP identified in this study as predictor of reproductive performance in heifers is localized within exon 2. This SNP is synonymous with C/T substitution; however, the substitution involves a functional region which transcribes to mRNA (i.e. functional mutation). Novel reports associate PAPP-A2 gene to early and late gestation^(37,38), which suggest polymorphisms from this gene could influence reproductive functions in cattle related to postpartum performance. However, this study identified molecular variants from PAPP-A2 gene associated to physiological mechanism related to puberty in purebred Romosinuano heifers. In summary, these studies propose the PAPP-A2 gene as predictor of the most important reproductive traits in beef cattle. Such traits include both puberty-associated (i.e. 15-mo pregnancy rate and age at first calving) and first-calf rebreeding traits (i.e. pregnancy rate, days to calving, calving interval and age at second calving). Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) is an important growth factor involved in various physiological processes including reproduction and fetal development⁽³⁹⁾. PAPP-A2 is responsible for proteolysis of IGFBP to increase IGF1 bioavailability, which may explain the positive effect of this protease to improve physiological mechanisms associated to fertility in cattle.

Because PAPP-A2 gene is located within chromosome 16 and GH-IGF endocrine axis within chromosome 5, results from this study suggest that

de RNAm por medio de un proceso denominado "ensamble alternativo"; o bien, estos polimorfismos podrían estar en desequilibrio de ligamiento con otros existentes dentro del mismo gen. Estos resultados, aunados a los encontrados en la presente investigación, sugieren que el gen PAPP-A2 estaría involucrado en la fertilidad del ganado de carne, tanto de las vaquillas como en las vacas primerizas. En otro estudio⁽²⁵⁾ se encontró asociación significativa entre tres polimorfismos del gen PAPP-A2 (rs109259828, rs109952914 y rs42301961), con caracteres productivos (ej. vida productiva, y producción de leche y proteína) y reproductivos (tasa de preñez y facilidad al parto de las hijas) en ganado lechero Holstein. Uno de los polimorfismos es no-sinónimo; sin embargo, aún y cuando los otros dos polimorfismos se encontraron en regiones no-funcionales (intrón 10), mostraron un alto grado de desequilibrio de ligamiento con otras regiones funcionales del gen (exones 10 y 11), las cuales sí se transcriben a RNA mensajero (RNAm). Esto sugiere un importante papel del gen PAPP-A2 para el mejoramiento de la fertilidad y producción láctea en ganado Holstein, por medio de su efecto positivo sobre el desarrollo pélvico óseo y la actividad mitótica de la glándula mamaria, respectivamente.

El gen PAPP-A2, localizado en el cromosoma 16, contiene 443,513 bases de pares y 22 exones. El polimorfismo del gen PAPP-A2 identificado en el presente estudio como predictor de la conducta reproductiva en vaquillas, se encuentra dentro del exón 2. Este es un polimorfismo sinónimo, que consiste en una sustitución de bases C/T que no causa cambio en la conformación protéica; sin embargo, la sustitución ocurre en una región funcional, por lo que la información será transcrita en una cadena de RNAm (mutación funcional). Reportes recientes han asociado al gen PAPP-A2 con la gestación inicial y tardía^(37,38), lo cual indica que polimorfismos de este gen podrían estar mayormente asociados con eventos reproductivos postparto en el ganado. Sin embargo, el presente estudio sugiere que variantes moleculares del gen PAPP-A2 también podrían asociarse a mecanismos fisiológicos relacionados con la pubertad en vaquillas Romosinuano de raza pura. Lo anterior resalta la importancia de polimorfismos del gen PAPP-A2

PAPP-A2 gene has the ability to interact functionally with other genes located in a different chromosome and regulate phenotypic reproductive traits. This approach has successfully identified candidate genes affecting similar biological functions (i.e., embryo survival and pregnancy rates) as described by Khatib *et al.*⁽⁴⁰⁾ y Wang *et al.*⁽⁴¹⁾.

Remaining polymorphisms unique to Romosinuano breed included in this study (n=6) were not associated ($P > 0.05$) to reproductive traits; then, linkage studies would be helpful to determine if these polymorphisms are causal mutations associated to functional SNP.

Finally, the additive effect of the alleles reported in this study is common in genetic studies that include only one pure breed (i.e. Romosinuano). In contrast, Luna-Nevarez *et al.*⁽¹¹⁾ reported a dominant effect of the alleles in a crossbred population involving *B. taurus* x *B. indicus* breeds, which suggest a dominant effect originated by heterosis.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

A polymorphism in the PAPP-A2 gene appears to be a predictor of reproductive performance in heifers and first-calf cows through and additive effect. A functional relationship among this gene and other genes belonging to GH-IGF endocrine axis has been suggested, as this axis underlies a region within chromosome 5 associated to fertility. Then, PAPP-A2 gene has been proposed as potential candidate gene to be included in assisted selection programs based on molecular markers, which lead to enhance the genetic improvement of the most important reproductive traits in Romosinuano beef cattle raised under subtropical environments.

End of english version

como predictores de los caracteres reproductivos de mayor importancia para el ganado bovino productor de carne. Dichos caracteres incluyen aquéllos asociados con la pubertad (ej. tasa de preñez a los 15 meses de edad y edad al primer

parto) y la fertilidad posparto (ej. tasa de preñez, días al parto e intervalo entre partos). El IGF-1 está involucrado en diversos procesos fisiológicos, incluyendo la reproducción y el desarrollo fetal⁽³⁹⁾. Por lo tanto, el efecto de PAPP-A2 sobre la fisiología reproductiva podría ser explicado por su actividad proteolítica sobre el IGFBP, con lo cual se inhibe la función de esta última, favoreciendo la disponibilidad del IGF-1 para regular mecanismos fisiológicos asociados a la fertilidad del ganado.

Debido a que el gen del PAPP-A2 se localiza dentro del cromosoma bovino 16 y el eje endocrino GH-IGF dentro del cromosoma 5, resultados de este estudio sugieren que el gen PAPP-A2 tiene la habilidad para interactuar con genes localizados en un cromosoma distinto (ej. cromosoma 5), con los cuales despliega una relación funcional al regular conjuntamente caracteres reproductivos. Este efecto multigénico ha sido previamente reportado como una estrategia efectiva para identificar genes que participan en la misma función biológica, tal y como los descritos por Khatib *et al*⁽⁴⁰⁾ y Wang *et al*⁽⁴¹⁾, propuestos como genes candidatos que influyen sobre la sobrevivencia embrionaria y la tasa de preñez.

De los restantes seis polimorfismos exclusivos de la raza Romosinuano, ninguno resultó ser predictor de los caracteres reproductivos evaluados, por lo que estudios de ligamiento serían útiles para determinar si estos podrían ser mutaciones causales asociadas a polimorfismos funcionales como el reportado en la presente investigación.

Finalmente, el efecto aditivo de los alelos encontrado es común en estudios asociativos como el presente, donde sólo se incluye una raza (ej. Romosinuano). En contraste, Luna-Nevarez *et al*⁽¹¹⁾ reportaron un efecto dominante de los alelos, lo cual sugiere una relación genética no-aditiva atribuible a la heterosis causada por la diversidad racial presente en dicho estudio, que incluyó cruza recíprocas *B. taurus* X *B. indicus*.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Este estudio identificó a un polimorfismo del gen PAPP-A2, el cual parece predecir el comportamiento reproductivo en vaquillas y vacas primerizas de la

raza Romosinuano, por medio un efecto aditivo. En base a lo anterior, se sugiere que el gen PAPP-A2 podría tener una relación funcional con los genes del eje endócrino GH-IGF, que se localizan en una región del cromosoma 5 asociada a la fertilidad. Por lo tanto, se propone al gen PAPP-A2 como un potencial gen candidato, el cual podría ser considerado dentro de un programa de selección asistida por marcadores moleculares, para agilizar el mejoramiento genético de caracteres reproductivos del ganado bovino de la raza Romosinuano criado bajo ambientes subtropicales.

LITERATURA CITADA

1. Thrift FA, Thrift TA. Rationale for evaluating alternative sources of subtropically adapted beef cattle germplasm. A Compilation of Research Results Involving Tropically Adapted Beef Breeds. Southern Coop Ser. Louis Agric Exp Stn, Baton Rouge; Bull. 405. 2005:6-15.
2. Martinez-Corral G. The Colombian Criollo breeds. In: Conservation of domestic animal genetic resources. Crawford RD, Lister EE, Buckley JT, editors. Rare Breeds International, Warwickshire, UK; 1995:161-166.
3. Hernandez-Ceron J, Chase CC Jr, Hansen PJ. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus breeds. J Dairy Sci 2004;87:53-58.
4. Riley DG, Chase CC Jr, Coleman SW, Olson TA. Evaluation of birth and weaning traits of Romosinuano calves as purebreds and crosses with Brahman and Angus. J Anim Sci 2007;85:289-298.
5. Hayes BJ, Bowman PJ, Chamberlain AJ, Goddard ME. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. J Dairy Sci 2009;92:433-443.
6. Van Tassell CP. Applications of whole genome assisted animal selection in the Dairy industry. Int Plant Anim Genome XVII; 2009.
7. Flint APF, Woolliams JA. Precision animal breeding. Phil Trans R Soc 2008;363:573-590.
8. Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. J Am Med Assoc 2008;299:1335-1344.
9. Dekkers JCM. Commercial applications of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. J Anim Sci 2004;82(Suppl):E313-E328.
10. Shirley KL, Thomas MG, Hallford DM, Silver GA, Beauchemin VR, Enns RM. Prediction of reproductive traits in Brangus heifers using a SNP and the translated product of the IGF-1 gene. Proc West Am Soc Anim Sci. 2005:(56).
11. Luna-Nevarez P, Rincon G, Medrano JF, Riley DG, Chase CC, Coleman SW, VanLeeuwen DM, *et al*. 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 2011;89:926-934.

12. Lucy MC. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: Implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reprod Domest Anim* 2008;43(Suppl 2):31-39.
13. Rhoads ML, Meyer JP, Kolath SJ, Lamberson WR, Lucy MC. Growth hormone receptor, insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-binding protein-2 expression in the reproductive tissue of early postpartum dairy cows. *J Dairy Sci* 2008;91:1802-1813.
14. Allan MF, Kuehn LA, Cusham RA, Snelling WM, Echterkamp SE, Thallman RM. Confirmation of QTL using a low density SNP map for twinning and ovulation rate on bovine chromosome 5. *J Anim Sci* 2009;87:46-56.
15. Kim ES, Shi X, Cobanoglu O, Weigel K, Berger PJ, Kirkpatrick BW. 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. *J Anim Sci* 2009;87:835-843.
16. Farber CR, Corva PM, Medrano JF. Genome-wide isolation of growth and obesity QTL using mouse speed congenic strains. *BMC Genomics* 2006;7:1-17.
17. Holly J, Perks C. The role of insulin-like growth factors binding proteins. *Neuroendocrinology* 2006;83:154-160.
18. Schindler C, Plumlee C. Interferons pen the JAK-STAT pathway. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:311-318.
19. Cooke RF, Arthington JD, Araujo DB, Lamb GC, Ealy AD. Effects of supplementation frequency on performance, reproductive, and metabolic responses of Brahman-crossbred females. *J Anim Sci* 2008;86:2296-2309.
20. Riley DG, Chase CC Jr, Coleman SW, Olson TA, Randel RD. Evaluation of tropically-adapted straightbred and crossbred beef cattle: Heifer age and size at first conception and characteristics of their first calves. *J Anim Sci* 2010;88:3173-3182.
21. Beef Improvement Federation. Guidelines for Uniform Beef Improvement Programs. 8th ed. [on line] <http://www.beefimprovement.org/library/06guidelines.pdf> Accessed Jan 24, 2006.
22. Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, Rubin EM, Dubchak I. VISTA: Computational tool for comparative genomics. *Nucleic Acid Res* 2004;32:W273-W279.
23. Rincon G, Thomas MG, Medrano JF. SNP identification in genes involved in GH-IGF1 signaling on BTA5. *Int Plant Anim* 2007; Genome XV:P536.
24. Garrett AJ, Rincon G, Medrano JF, Elzo MA, Silver GA, Thomas MG. Promoter region of the bovine growth hormone receptor gene: Single nucleotide polymorphism discovery in cattle and association with performance in Brangus bulls. *J Anim Sci* 2008;86:3315-3323.
25. Wickramasinghe S, Rincon G, Medrano JF. Pregnancy associated plasma protein-A2 in BTA 16 is associated with daughter calving ease and productive life in Holstein cattle. *J Dairy Sci* 2011;94:1552-1558.
26. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: Analysis and visualization of LD and hapotype maps. *Bioinformatics* 2005;21:263-265.
27. Gabriel S, Ziaugra L, Tabbaa D. SNP genotyping using the Sequenom Massarray iPLEX platform. In: Wiley J editor. *Current Protocols in Human Genetics*. Online library, USA: Wiley Interscience; 2009:1-18.
28. Saxton AM, Balzarini MG, Cappio-Borlino A, Czika W, Fry JD, Gibson G, Guerra JL, *et al.* Genetic analysis of complex traits using SAS. SAS Institute, Inc., North Carolina; 2004.
29. Littell RC, Stroup WW, Freund RJ. SAS for linear models, 4th Ed. SAS Institute Inc., Cary, NC; 2002.
30. Weir BS. Forensics. In: *Handbook of Statistical Genetics*. Balding DJ, Bishop M, Cannings C editors. New York, NY: John Wiley and Sons, LTD; 2001.
31. Falconer DS, Mackay TFC. *Introduction to quantitative genetics*. 4th Ed. New York, NY: Longman Scientific and Technical; 1996.
32. Sherman EL, Nkrumah JD, Murdoch BM, Li C, Wang Z, Fu A, Moore SS. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide 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* 2008;86:11-16.
33. Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Reviews* 2006;7:781-791.
34. Christians JK, Hoeflich A, Keightley PD. PAPP2, an enzyme that cleaves an Insulin-Like Growth-Factor-Binding Protein, is a candidate gene for a quantitative trait locus affecting body size in mice. *Genetics* 2006;173:1547-1553.
35. Gyru C, Oxvig C. Quantitative analysis of insulin-like growth factor-modulated proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-4 and -5 by pregnancy-associated plasma protein-A. *Biochemistry* 2007;46:1972-1980.
36. Pavelic J, Matijevic T, Knezevic J. Biological and physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family. *Indian J Med Res* 2007;125:511-522.
37. Nishizawa H, Pryor-Koishi K, Suzuki M, Kato T, Kogo H, Sekiya T, Kurahashi H, Udagawa Y. Increased levels of pregnancy-associated plasma protein-A2 in the serum of pre-eclamptic patients. *Mol Hum Reprod* 2008;14:595-602.
38. Winn VD, Gormley M, Paquet AC, Kjaer-Sorensen K, Kramer A, Rumer KK, Haimov-Kochman R, Yeh RF, Overgaard MT, Varki A, Oxvig C, Fisher SJ. Severe preeclampsia-related changes in gene expression at the maternal-fetal interface include sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-6 and Pappalysin-2. *Endocrinology* 2009;150:452-462.
39. Sheen W, Wisniowsky P, Ahmed L, Doyle DW, Denne SC, Liechty EA. Protein anabolic effects of insulin and IGF-I in the ovine fetus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;28:47-48.
40. Khatib H, Monson RL, Schutzkus V, Kohl DM, Rosa GJM, Rutledge JJ. Mutations in the *STAT5A* gene are associated with embryonic survival and milk composition in cattle. *J Dairy Sci* 2008;91:784-793.
41. Wang X, Maltecca C, Tal-Stein R, Lipkin E, Khatib H. Association of bovine fibroblast growth factor 2 (FGF2) gene with milk fat and productive life: An example of the ability of the candidate pathway strategy to identify quantitative trait genes. *J Dairy Sci* 2008;91:2475-2480.