

Orinoquia, Enero-Junio 2020;24(1): 42-51
ISSN electrónico 2011-2629.
ISSN impreso 0121-3709.
<http://doi.org/10.22579/20112629.590>

Polimorfismos del gen del receptor para la hormona luteinizante (LHR – LHGCR) en folículos ováricos de vacas Romosinuano y Brahman ciclando

Luteinizing hormone choriogonadotropin receptor (LHGCR) gene polymorphism in ovarian follicles from cycling Romosinuano and Brahman cows

Polimorfismos do gene receptor para o hormônio luteinizante (LHR - LHGCR) em folículos ováricos de vacas Romosinuano e Brahman no ciclo

Álvaro Vejarano-Orjuela¹, Aureliano Hernández-Vásquez², Iang S. Rondón-Barragán³, Rafael A. Suárez-Mesa¹

¹ MVZ, MSc, (c)PhD, Grupo de Investigación en Genética y Biotecnología de la Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Tolima, Ibagué, Tolima, Colombia

² MVZ, MSc, PhD, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

³ MVZ, MSc, PhD, Grupo de Investigación en Inmunobiología y Patogénesis, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Tolima, Ibagué, Tolima, Colombia

Email: avejaran@ut.edu.co

Recibido: 17 de junio de 2019

Aceptado: 16 de marzo de 2020

Resumen

El gen del receptor para la hormona luteinizante (LHR-LHCGR) es un gen altamente conservado y su mRNA origina diferentes variantes por corte y empalme alternativo (*splicing* alternativo). En bovinos se han reportado variantes que traducen en proteína pero ésta no atraviesa la membrana celular; en humanos ante una delección del exón 10 no hay respuesta a la acción de la LH, por lo tanto, es razonable asumir que las diferencias en la respuesta a la LH estén relacionadas con la expresión de los LHR. El objetivo de este trabajo fue comparar entre la raza criolla Colombiana Romosinuano y la raza Brahman los posibles polimorfismos del ARNm del gen como potenciales indicadores de fertilidad. Se tomaron 5 vacas ciclando de cada raza se extirpó el ovario que contenía un folículo preovulatorio, se retiró la pared folicular, se extrajo el RNA total y se sintetizó, amplificó, secuenció y comparó el ADNc contra secuencias ya reportadas, presentando una alta similitud. Se concluye que en estas razas la ausencia de variantes en la expresión del gen, estaría asociada a buen desempeño reproductivo.

Palabras clave: bovinos criollo reproducción; LHR-LHCGR

Como Citar (Norma Vancouver):

Vejarano-Orjuela Á, Hernández-Vásquez A, Rondón-Barragán IS, Suárez-Mesa RA. Polimorfismos del gen del receptor para la hormona luteinizante (LHR – LHGCR) en folículos ováricos de vacas Romosinuano y Brahman ciclando. Orinoquia, 2020;24(1): 42-51. DOI: <http://doi.org/10.22579/20112629.590>

Abstract

The luteinizing hormone (LH) choriogonadotropin receptor (LHCGR) gene is highly conserved and its mRNA causes variants by alternative splicing. Variants have been reported in cattle that translate into protein; however, this does not cross the cell membrane. Exon 10 deletion in humans does not trigger a response to the action of LH; it is therefore reasonable to assume that differences regarding response to LH are related to LHR expression. This work was aimed at comparing the Colombian creole Romosinuano breed to the Brahman breed regarding possible HCGR gene mRNA polymorphisms as potential fertility indicators. Five cycling cows were taken from each breed and the ovaries containing pre-ovulatory follicles were excised, the follicular wall was removed and total RNA extracted. The cDNA was synthesised, amplified, sequenced and compared to already reported sequences, great similarity being observed. It was concluded that the lack of variants regarding gene expression in these breeds would be associated with good reproductive performance.

Key words: bovine creole reproduction; LHR–LHCGR; fertility indicator.

Resumo

O gene do receptor para o hormônio luteinizante (LHR-LHCGR) é altamente conservado e seu mRNA origina diferentes variantes por splicing alternativo. Em bovinos, foram registradas variantes que se traduzem em proteína, mas esta não atravessa a membrana celular; em humanos quando há uma deleção do exon 10 não há nenhuma resposta à ação do LH, portanto, é possível que as diferenças na resposta ao LH estão relacionados à expressão do LHR. O objetivo deste estudo foi comparar os polimorfismos do mRNA do gene entre a raça crioula colombiana Romosinuano e a raça Brahman, como potenciais indicadores de fertilidade. Foram avaliadas cinco fêmeas de cada raça, retirou-se o ovário que continha um folículo pré-ovulatório, retirou-se a parede folicular, o RNA total foi extraído. Se sintetizou, amplificou, sequenciou e comparou o cDNA com sequencias já descritas, a qual apresentou alta semelhança.

Palavras chave: reprodução de bovinos crioulos; LHR–LHCGR

Introducción

El eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal controla todos los estados de la reproducción. El hipotálamo produce hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual se moviliza a la hipófisis anterior y estimula la secreción de hormona folículo estimulante (Senger, 2012) y de hormona luteinizante (LH) (Casarini *et al.*, 2011).

La LH es una hormona Glucoproteica heterodimérica cuya vida media es de unos 20 minutos (Gay *et al.*, 1970). Está estructuralmente conformada por dos cadenas, una α , la cual comparte con otras hormonas como la FSH (McArdle y Roberson, 2015) y una β que le confiere la especificidad biológica (Cadagan y Towlson, 2017).

En bovinos y ovinos, los estados finales del desarrollo folicular requieren de pulsos de LH (Rawan *et al.*, 2015); si la secreción de progesterona permanece alta, los pulsos de LH no se darán más rápidamente y el folículo se atresiará, induciendo una nueva onda folicular (Ginther, 2000).

La habilidad de las gonadotropinas para modular el crecimiento folicular depende no sólo de los niveles circulantes de estas hormonas, sino también de la expresión de receptores específicos que se encuentran embebidos en la membrana de las células de la granulosa y de la teca interna del folículo ovárico Richards y Hedin, (1988); Rawan *et al.*, (2015).

El gen del LHR es un gen altamente conservado en vertebrados, se encuentra en peces (Clelland y Peng,

2009; Liu *et al.*, 2011), aves (Johnson *et al.*, 1996) y mamíferos y en el bovino está ubicado en el cromosoma 11, identificado con código GenelID: 281900. (Genbank 2020). Este gen se expresa en las gónadas junto con el receptor de la FSH (FSHR), mientras que receptor el de la GnRH lo hace en la hipófisis anterior, está sujeto a corte y empalme alternativo (*splicing* alternativo), dando origen a diferentes variantes del mRNA del gen (Ma *et al.*, 2012); en bovinos se han reportado variantes que carecen del exón 10, delección parcial del exón 11 (Robert *et al.*, 2003; Nogueira *et al.*, 2007) y del exón 3 (Nogueira *et al.*, 2007).

Aunque las propiedades de unión y funcionales de esas variantes no han sido completamente dilucidadas, se ha observado que la variante con delección parcial del exón 11 traduce en proteína pero ésta no atraviesa la membrana celular (Kawate, 2004), por lo tanto, es razonable asumir que las diferencias en la respuesta a la LH estén relacionada con la expresión de los LHR (Mamluk *et al.*, 1998) ya que en humanos por ejemplo, la función de los LHR se pierde cuando se presentan mutaciones en los exones 8 y 10 e igualmente, ante una delección del exón 10, no hay respuesta a la acción de la LH aunque si a la hCG (Dickinson *et al.*, 2009).

Este trabajo tuvo como objetivo comparar entre la raza criolla colombiana Romosinuano y la raza Brahman los posibles polimorfismos del ARNm del gen que codifica

para el receptor de la hormona luteinizante, como potenciales indicadores del potencial ovulatorio.

Materiales y métodos

El trabajo contó con la aprobación del comité de bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia y se desarrolló en el Centro Universitario Regional del Norte (CURDN) de la Universidad del Tolima, ubicado en el kilómetro 80 de la carretera que de Ibagué conduce al municipio de Armero-Guayabal, con temperatura media de 28.2 °C, precipitación anual media de 1.791 mm, humedad relativa de 71 % y Altitud entre 275 - 550 m.s.n.m., clasificado como zona de vida: Bosque seco tropical (bs-T) (Holdridge, 1967). Los procedimientos moleculares se realizaron en las instalaciones del laboratorio de biología molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Tolima.

Se tomaron 5 vacas de la raza Romosinuano (RS) y 5 Brahman (Br) con edad entre tres y cinco años, que habían registrado por lo menos un parto, clínicamente sanas y cíclicas, las cuales permanecieron en potreros establecidos en pasto Ángleton (*Dichanthium aristatum*) y contaron con sal mineralizada y agua a voluntad.

Para verificar ciclicidad ovárica, a las 10 hembras se les realizó diariamente seguimiento ecográfico durante tres ciclos estrales, usando la técnica descrita por Pierson y Ginther (1988), mediante la utilización de un equipo Aquila, con sonda dual de 6.0 y 8.0 MHz. (Pie Medical. <http://www.piemedicalimaging.com/>), registrando las imágenes en una computadora portátil mediante el uso de una tarjeta exportadora importadora de video Pinnacle®. La detección de estros se realizó por observación directa con la ayuda de un macho con desviación lateral del prepucio, entre las 05:30 y las 06:00 horas, las 09:30 y las 10:00, las 13:30 y las 14:00, las 17:30 y las 18:00 y entre las 21:30 y las 22:00.

A partir de la aparición de cada uno de los celos, se realizó ecografía cada 4 horas para precisar el lapso transcurrido entre el inicio de los signos de celo y la ovulación; el tiempo de ovulación se definió como el tiempo promedio de no observación del folículo a la ecografía, menos dos horas (Larsson, 1987).

Durante el tercer estro, se verificó por ultrasonografía la presencia del folículo preovulatorio y se extirpó el ovario que contenía dicho folículo, mediante abordaje lateral derecho, siguiendo la técnica descrita por Peiró *et al.*,(2009).

Para el procedimiento quirúrgico las vacas se sedaron con xilacina aplicada por vía intravenosa (IV) a una posología de 0,05 a 0,1 mg/kg, ketamina (IV) a una posología de 0.5 mg/kg y se practicaron bloqueos paravertebral y locales con lidocaína al 2%.

Una vez obtenidos los ovarios, se realizó un corte sobre el estigma del folículo preovulatorio para seccionarlo en dos partes iguales:

A una de las partes se le retiró delicadamente la pared folicular mediante el uso de una pinza de disección sin garra, ésta se transportó al laboratorio en RNA Later® a 4 °C y se conservó a -20 °C hasta su procesamiento.

Del tejido folicular se extrajo el RNA total usando kit comercial AMBION PureLink™ RNA Mini Kit® siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el RNA, se realizó la determinación de su concentración mediante el uso de espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 Thermo Scientific. La pureza del RNA se estableció haciendo uso de la relación 260 : 280.

A partir de 2 µg del RNA total, se sintetizó un ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) utilizando el Kit de síntesis de ADNc con transcriptasa reversa SuperScript™ II, ThermoFisher Scientific (Invitrogen-USA). El ADNc obtenido se usó como plantilla para identificar la expresión génica. Inicialmente, se evaluó la calidad de síntesis del ADNc mediante la amplificación del gen de la β-actina como gen *housekeeping* de control interno. El PCR de punto final se realizó mediante los siguientes pasos: pre-desnaturalización a 95°C por 3 minutos (min), desnaturalización a 95°C por 30 segundos (seg), anillamiento a 55°C por 30 seg, extensión a 72°C por 30 seg, en 35 ciclos y un paso de extensión final a 72°C por 5 min, en el termociclador T100 de Bio-Rad. Posterior a la amplificación, el producto de la reacción se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio como intercalante, corrido a 100 voltios por 50 min en el equipo electroforético Power-Pac HC (Bio-Rad-USA), siguiendo los protocolos estandarizados del laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad del Tolima.

Para detectar la expresión de los segmentos de interés LHR-A y LHR-B del gen para el receptor de LH en las células foliculares, se estableció la presencia del mRNA mediante ejecución de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) usando SuperScript™ II ThermoFisher Scientific y amplificación mediante PCR de punto final.

Para la realización de la RT-PCR se siguieron los procedimientos descritos por Nogueira (2007), se utilizó un

cebador directo para un fragmento de gran parte de dominio extracelular (LHR-A) en el exón 2 (5'-TCAAAGTAATCCCATCTCAAGC-3') y uno inverso en el exón 9 (5'-CTCGTTTGTGGCAAGTTCT-3'); y los cebadores directo (5'-AAACTTGCCAACAAACGA-3') e inverso (5'-ATAGCAAGTCTTGCCAGGA-3') en los exones 9 y 11 respectivamente, para el dominio de toda la región de transmembrana (LHR-B), del gen del receptor. Figura 1.

Para la PCR de punto final para los fragmentos LHR-A y LHR-B de la región codificante del LHR se siguieron los siguientes pasos: pre-desnaturalización a 95°C por 10 minutos (min), desnaturalización a 95°C por 1 min, anillamiento a 64°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min, en 35 ciclos y un paso de extensión final a 72°C por 7 min. Posterior a la amplificación, el producto de la reacción se reveló mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de Etidio como intercalante, con un corrido a 100 voltios por 60 minutos.

Los productos amplificados por PCR de punto final fueron visualizados mediante el uso de geles de agarosa al 1%, aplicando 100v durante 60 minutos.

Las bandas observadas en los geles fueron cortadas, purificadas y enviadas a MACROGEN (Corea) para establecer mediante secuenciación del cADN del gen que codifica para el receptor, los polimorfismos de los LHR-mRNA presentes en las muestras.

Las secuencias recibidas se analizaron haciendo uso del software Geneious R8 y se usó el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para compararlas con otras secuencias que han sido previamente reportadas en el *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, BTU20504 y XM_019969469 para *Bos taurus* y *Bos indicus* respectivamente. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Resultados

La visualización mediante geles de agarosa de los productos de amplificación de los cDNA para los fragmentos LHR-A y LHR-B se presentan en la figura 2.

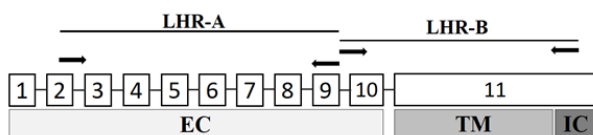


Figura 1. Representación de la ubicación de los cebadores (flechas) para la PCR de los fragmentos LHR-A y LHR-B. Los recuadros numerados representan los exones. Se muestran los dominios de la proteína (EC, extracelular TM región de transmembrana e IC, dominio intracelular. Nogueira *et al.*, (2007).

Las bandas sugirieron la presencia de un solo polimorfismo para los fragmentos LHR-A y LHR-B, obtenidas a partir de tejido de folículos preovulatorios tanto en la raza RS como en la raza Br. Esta situación fue corroborada por las secuencias obtenidas, ya que para el caso de las hembras de la raza RS el tamaño de los fragmentos codificantes LHR-A y LHR-B del receptor de la hormona luteinizante presentaron una longitud de 630 y de 792 pares de bases respectivamente y para las hembras de la raza Brahman una longitud de 511 y 751 respectivamente.

En la figura 3 se representa la región codificante del gen para el receptor de la hormona luteinizante y la alineación de la secuencias consensus extraídas a partir de los resultados de secuenciación de los fragmentos LHR-A y LHR-B de la raza Romosinuano, contra la secuencias de LHR del GenBank de BTU20504 de *Bos taurus*.

Como se puede observar, la secuencia codificante de los fragmentos LHR-A y LHR-B de hembras de la raza RS de 630 y de 792 pares de bases al ser comparados en el Blast contra la secuencia de referencia LHR en el Genbank de *Bos Taurus* BTU20504, presentaron una completa similitud (100%) entre secuencias. Tabla 1.

Parámetro obtenido mediante software Geneious R8.

La comparación entre las secuencias obtenidas para los fragmentos LHR-A y LHR-B de la región codificante del gen del receptor para LH de la raza RS con la secuencia de referencia del Genbank U20504, se presentan en las figuras 4 y 5.

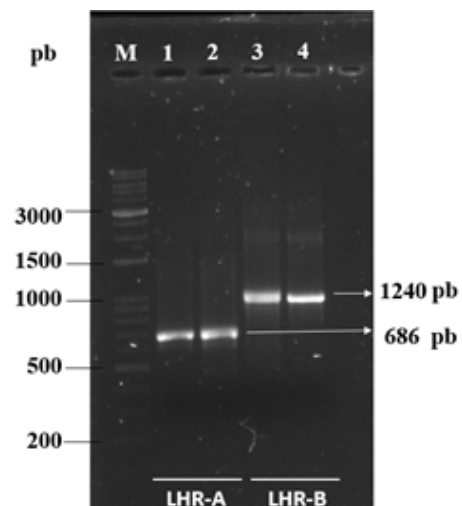


Figura 2. Electroforesis de los fragmentos LHR-A y LHR-B, de vacas de las razas Romosinuano (RS) y Brahman (Br). Carriles 1 y 3: RS, 2 y 4: Br.

En la figura 6 se observa la representación de la secuencia codificante de los fragmentos LHR-A y LHR-B obtenidos para el receptor de la hormona luteinizante a partir de tejido de folículos preovulatorios de hembras de la raza Br, éstos presentaron respectivamente una longitud de 511 y 751 pares de bases, se estableció mediante Blast que los fragmentos del LHR A y B presentaron alta similitud con la secuencia del gen de LHR XM_019969469 de *Bos indicus* en el Genbank (98 y 99%).

Las comparaciones entre las secuencias obtenidas para los fragmentos LHR-A y LHR-B de la región codificante del gen del receptor para LH de la raza Brahman contra la secuencia de referencia del XM_019969469 del Genbank, se presentan en las figuras 7 y 8.

Como se puede observar, la secuencia codificante obtenida en presente trabajo de los fragmentos LHR-A y LHR-B de hembras de la raza Brahman de 511 y de 751 pares de bases al ser comparados en el Blast contra la secuencia de referencia LHR en el Genbank XM_019969469, presentaron una alta similitud (98-99% respectivamente) entre secuencias.

Discusión

El análisis comparativo de la secuencia codificante para los fragmentos LHR-A y LHR-B obtenidos el receptor de la hormona luteinizante a partir de tejido de folículos preovulatorios de hembras de la raza Romosinuano y Brahman, contra las secuencia de referencia del Genbank B20504 y XM_019969469 de *Bos indicus*, se realizó para identificar posibles variantes que confieran diferencias en el potencial ovulatorio y por

Tabla 1. Porcentaje de similitud entre la secuencia para los fragmentos LHR-A y LHR-B para la raza RS y la secuencia de referencia U20504

	Extracción consenso	U20504
Extracción consenso	LHR-A ROMO	100
U20504*	100	

*Genbank

ende diferencias en su desempeño reproductivo, observables en la tasas de fertilidad de las dos razas.

En ambas razas las secuencias obtenidas para los fragmentos LHR-A y LHR-B corresponden a segmentos de las secuencias de longitud completa reportadas en las bases de datos.

Para la raza RS el fragmento LHR-A presentó una longitud de 630 bp, se observó que existe una identidad desde el nucleótido 18 de la secuencia consenso con el 232 de la BTU 20504, hasta el nucleótido 647 con el 861 de las secuencias consenso y BTU 20504 respectivamente, es decir en los 630 nucleótidos perteneciente a una región del dominio extracelular del gen, lo que corresponde con lo reportado por Robert *et al.*, (2003), como clon A y por Nogueira *et al.*, (2007), como LHR-A1 para la secuencia de la fracción codificante completa de la región extracelular, es decir sin adiciones ni deleciones, condición que permitiría un desempeño reproductivo normal, sustentado por la regularidad de los ciclos en cuanto a la presentación de los estros y la ovulación de los animales estudiados de la raza Romosinuano, ya que en la observación ultrasonográfica de los ovarios durante los tres ciclos previos a la obtención de los tejidos no se presentaron estros anovulatorios ni ovulaciones sin exhibición de signos de estro.

El fragmento LHR-B obtenido en este trabajo presentó una longitud de 792 bp y corresponde a parte del de los dominios de transmembrana e intracelular del receptor. Se observó que existe identidad desde el nucleótido 72 de la secuencia consenso con el 1226 de la BTU 20504, hasta el nucleótido 864 con el 2018 de las secuencias consenso y BTU 20504 respectivamente, lo que concuerda con lo reportado por Robert *et al.*, (2003), como clon A y por Nogueira *et al.*, (2007), como LHR-B3, para la secuencias de las fracciones codificantes completa de la región de transmembrana y parte intracelular.

De igual manera en lo referente a la raza Brahman, el fragmento LHR-A presentó una longitud de 511 bp, se observó que existe una identidad del 98% desde el nu-

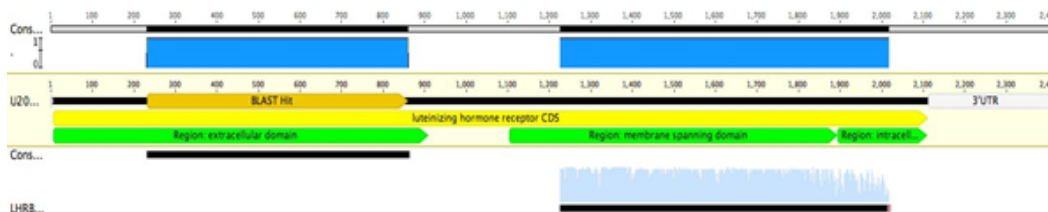


Figura 3. Representación gráfica de los fragmentos LHR-A y LHR-B secuenciados para la raza RS, sobre la región codificante U20504 (Genbank). Software Geneious R8.

Consensus extraction	LHR-A1 ROMO	18 GAGGTCATAAAAAATTGAAATCTCTCAGAGTGATTCCCTGGAAAAGATAGAAGCTAATGCC 77 GAGGTCATAAAAAATTGAAATCTCTCAGAGTGATTCCCTGGAAAAGATAGAAGCTAATGCC
U20504		232 GAGGTCATAAAAAATTGAAATCTCTCAGAGTGATTCCCTGGAAAAGATAGAAGCTAATGCC 291
Consensus extraction	LHR-A ROMO	78 TTTGACAACCTCCTCAATTTGCTGAAATACTGATCCAGAACACTAAAAACCTGGTGCAC 137 TTTGACAACCTCCTCAATTTGCTGAAATACTGATCCAGAACACTAAAAACCTGGTGCAC
U20504		292 TTTGACAACCTCCTCAATTTGCTGAAATACTGATCCAGAACACTAAAAACCTGGTGCAC 351
Consensus extraction	LHR-A1 ROMO	138 ATTGAGGCTGGAGCGTTTACAAATCTCCCTCGGTAAAAATACCTAAGCATCTGTAATACA 197 ATTGAGGCTGGAGCGTTTACAAATCTCCCTCGGTAAAAATACCTAAGCATCTGTAATACA
U20504		352 ATTGAGGCTGGAGCGTTTACAAATCTCCCTCGGTAAAAATACCTAAGCATCTGTAATACA 411
Consensus extraction	LHR-A1 ROMO	198 GGCATCCACAAGCTTCCAGATGTTACGAAGATCTTCTCCTGTAATTTAATTCATTCTG 257 GGCATCCACAAGCTTCCAGATGTTACGAAGATCTTCTCCTGTAATTTAATTCATTCTG
U20504		412 GGCATCCACAAGCTTCCAGATGTTACGAAGATCTTCTCCTGTAATTTAATTCATTCTG 471
Consensus extraction	LHR-A1 ROMO	258 GAAATTTGTGATAACTTACACATAACCACCATAACCAAGAAATGCTTTTCAAGGGATGAAT 317 GAAATTTGTGATAACTTACACATAACCACCATAACCAAGAAATGCTTTTCAAGGGATGAAT
U20504		472 GAAATTTGTGATAACTTACACATAACCACCATAACCAAGAAATGCTTTTCAAGGGATGAAT 531
Consensus extraction	LHR-A1 ROMO	318 AACGAATCCATAACGCTAAAACCTATATGGAATGGATTTGAAGAAATACAAAGTCATGCA 377 AACGAATCCATAACGCTAAAACCTATATGGAATGGATTTGAAGAAATACAAAGTCATGCA
U20504		532 AACGAATCCATAACGCTAAAACCTATATGGAATGGATTTGAAGAAATACAAAGTCATGCA 591
Consensus extraction	LHR-A1 ROMO	378 TTCAATGGGACAACGCTGATTTCCCTGGAGCTGAAGGAAAATGCACGCCTGGAGAAGATG 437 TTCAATGGGACAACGCTGATTTCCCTGGAGCTGAAGGAAAATGCACGCCTGGAGAAGATG
U20504		592 TTCAATGGGACAACGCTGATTTCCCTGGAGCTGAAGGAAAATGCACGCCTGGAGAAGATG 651
Consensus extraction	LHR-A ROMO	438 CACAACGACGCCTTCCGGGGGGCCACGGGGCCTAGCATTTTGGATATTTCTTCCACTAAA 497 CACAACGACGCCTTCCGGGGGGCCACGGGGCCTAGCATTTTGGATATTTCTTCCACTAAA
U20504		652 CACAACGACGCCTTCCGGGGGGCCACGGGGCCTAGCATTTTGGATATTTCTTCCACTAAA 711
Consensus extraction	LHR-A ROMO	498 CTGCAGGCCCTGCCTACCTACGGGCTAGAGTCCATTAGACACTAATTGCCACATCATCC 557 CTGCAGGCCCTGCCTACCTACGGGCTAGAGTCCATTAGACACTAATTGCCACATCATCC
U20504		712 CTGCAGGCCCTGCCTACCTACGGGCTAGAGTCCATTAGACACTAATTGCCACATCATCC 771
Consensus extraction	LHR-A ROMO	558 TATTCTGAAAAAACTGCCATCGAGAGAAAAATTTACCAACCTCCTGGATGCCACACTG 617 TATTCTGAAAAAACTGCCATCGAGAGAAAAATTTACCAACCTCCTGGATGCCACACTG
U20504		772 TATTCTGAAAAAACTGCCATCGAGAGAAAAATTTACCAACCTCCTGGATGCCACACTG 831
Consensus extraction	LHR-A ROMO	618 ACTTACCCAGCCACTGCTGTGCTTTTAGA 647 ACTTACCCAGCCACTGCTGTGCTTTTAGA
U20504		832 ACTTACCCAGCCACTGCTGTGCTTTTAGA 861

Figura 4. Comparación entre la secuencia de la región codificante del fragmento LHR-A RS y la secuencia de referencia Bos taurus U20540 del Genbank. *Identities* = 630/630 (100%), *Gaps* = 0/630 (0%). Software Genious R8.

cleótidio 577 de la secuencia consensus con el 508 de la XM_019969469, hasta el nucleótido 64 con el 1023 de las secuencias consensus y XM_019969469 respectivamente, es decir en 507/516 nucleótidos perteneciente a una región del dominio extracelular del gen, lo que corresponde de igual manera con la secuencia de longitud completa reportada por Robert *et al.*, (2003), como clon A y por Nogueira *et al.*, (2007), como LHR-A1 para la secuencia de la fracción codificante completa de la región extracelular.

El fragmento LHR-B obtenido en este trabajo presentó una longitud de 751 bp y corresponde a parte del de los dominios de transmembrana e intracelular del receptor. Se observó que existe identidad desde el nucleótido 64 de la secuencia consensus con el 1445 de la XM_019969469, hasta el nucleótido 819 con el

2200 de las secuencias consensus y XM_019969469 respectivamente, lo que concuerda con lo reportado por Robert *et al.*, (2003) como clon A y por Nogueira *et al.*, (2007) como LHR-B3, para la secuencias de las fracciones codificantes completa de la región de transmembrana y parte intracelular.

Al parecer en las secuencias estudiadas para los dos fragmentos en razas RS y Br no se presentaron inserciones ni deleciones que comprometieran la acción del ligando. Tampoco se presentaron polimorfismos de nucleótido simple como los reportados por Vásquez *et al.*, (2014) o Hastings *et al.*, (2006) asociados a la fertilidad en ganado lechero.

En conclusión se puede expresar que aunque el gen objeto de este trabajo es apenas uno de los muchos

U20504 (BTU20504)	1226 ACUUCUGCAUGGGGCUCUACCUGCUGCUCAUUGCCUCAGUCGAUGCCCAGACCAAAGGCC 1285 ACTTCTGCATGGGGCTCTACCTGCTGCTCATTGCCTCAGTCGATGCCAGACCAAAGGCC
LHR-B extraction ROMO	72 ACTTCTGCATGGGGCTCTACCTGCTGCTCATTGCCTCAGTCGATGCCAGACCAAAGGCC 131
U20504 (BTU20504)	1286 AGUAUUACAACCAUGCCAUAGACUGGCAGACAGGGAGUGGGUGCAGCGCGCUGGCCUUUU 1345 AGTATTACAACCATGCCATAGACTGGCAGACAGGGAGTGGGTGCAGCGCGGCTGGCTTTT
LHR-B extraction ROMO	132 AGTATTACAACCATGCCATAGACTGGCAGACAGGGAGTGGGTGCAGCGCGGCTGGCTTTT 191
U20504 (BTU20504)	1346 UCACUGUGUUUGCAAGUAGAACUCUCUGUCUACACCCUCACAGUCAUCACACUAGAAAGAU 1405 TCACTGTGTTTGAAGTAACTCTCTGTCTACACCCTCACAGTCATCACACTAGAAAGAT
LHR-B extraction ROMO	192 TCACTGTGTTTGAAGTAACTCTCTGTCTACACCCTCACAGTCATCACACTAGAAAGAT 251
U20504 (BTU20504)	1406 GGCACACCAUCACCUAUGCUAUUCAACUGGACCAAAAGCUGCGACUGAAACAUGCCAUUC 1465 GGCACACCATCACCTATGCTATTCAACTGGACCAAAAGCTGCGACTGAAACATGCCATTC
LHR-B extraction ROMO	252 GGCACACCATCACCTATGCTATTCAACTGGACCAAAAGCTGCGACTGAAACATGCCATTC 311
U20504 (BTU20504)	1466 CAGUCAUGCUCGGAGGAUGGCUCUUUUCUACUCUCAUUGCCGUGUUGCCUCUUGUGGGUG 1525 CAGTCATGCTCGGAGGATGGCTTTTTCTACTCTCATTGCCGTGTGCCTTTGTGGGTG
LHR-B extraction ROMO	312CAGTCATGCTCGGAGGATGGCTTTTTCTACTCTCATTGCCGTGTGCCTTTGTGGGTG 371
U20504 (BTU20504)	1526 UCAGCAAUACAUGAAGGUCAGCAUUUGCCUCCCAUGGAUGUGAAAGCACUCUCUCAC 1585 TCAGCAATTACATGAAGGTCAGCATTTCCTCCCATGGATGTGGAAAGCACTCTCTCAC
LHR-B extraction ROMO	372 TCAGCAATTACATGAAGGTCAGCATTTCCTCCCATGGATGTGGAAAGCACTCTCTCAC 431
U20504 (BTU20504)	1586 AGGUCUACAUCUUAACCAUCCUGAUUCUCAACGUGAUGGCCUUCAUCAUUAUUUGUCUU 1645 AGGTCTACATCTTAACCATCTGATTCTCAACGTGATGGCCTTCATCATCATTTGTGCTT
LHR-B extraction ROMO	432 AGGTCTACATCTTAACCATCTGATTCTCAACGTGATGGCCTTCATCATCATTTGTGCTT 491
U20504 (BTU20504)	1646 GCUACAUUAAAAUUUUUUGCAGUUCAAAAUCCAGAGCUGAUGGCCUACCAACAAAGAU 1705 GCTACATTAATAATTTATTTTGCAGTTCAAAATCCAGAGCTGATGGCTACCAACAAAGATA
LHR-B extraction ROMO	492 GCTACATTAATAATTTATTTTGCAGTTCAAAATCCAGAGCTGATGGCTACCAACAAAGATA 551
U20504 (BTU20504)	1706 CAAAGAUUGCUAAGAAAAUGGCAGUCCUCAUCUUCACCGAUUUCACCUUGCAUGGCACCAA1765 CAAAGATTGCTAAGAAAATGGCAGTCTCATCTTCACCGATTTACCTGCATGGCACCAA
LHR-B extraction ROMO	552 CAAAGATTGCTAAGAAAATGGCAGTCTCATCTTCACCGATTTACCTGCATGGCACCAA 611
U20504 (BTU20504)	1766 UCUCUUUCUUUGCCAUCUCAGCUGCCUUCAAAGUGCCCUCAUUACAGUAACCAACUCA 1825 TCTCTTTCTTTGCCATCTCAGCTGCCTCAAAGTGCCCTCATTACAGTAACCAACTCAA
LHR-B extraction ROMO	612 TCTCTTTCTTTGCCATCTCAGCTGCCTCAAAGTGCCCTCATTACAGTAACCAACTCAA 671
U20504 (BTU20504)	1826 AGGUUCUACUGGUUCUCUUUUUUCUGUCAUUUCAUGCGCCAUCUGGUUCUGUACGCAA 1885 AGGTCTACTGGTTCTCTTTATCCTGTCAATTCATGCGCCAATCCGTTTCTGTACGCAA
LHR-B extraction ROMO	672 AGGTCTACTGGTTCTCTTTATCCTGTCAATTCATGCGCCAATCCGTTTCTGTACGCAA 731
U20504 (BTU20504)	1886 UUUUCACAAAGGCAUCCAAAGGGAUUUCUUUCUGUUGCUGAGCAAAUUUGGCUGCUGUA 1945 TTTTCAAAAGGCATTCCAAAGGGATTTCTTTCTGTTGCTGAGCAAAATTTGGCTGCTGTA
LHR-B extraction ROMO	732 TTTTCACAAAGGCATTCCAAAGGGATTTCTTTCTGTTGCTGAGCAAAATTTGGCTGCTGTA 791
U20504(BTU20504)	1946 AAUAUCGAGCUGAACUUUAUAGGAGGAAGGAUUUUUCAGCUUAUAUCUCCAACUGCAAAA 2005 AATATCGAGCTGAACCTTATAGGAGGAAGGATTTTCAGCTTATATCTCCAAGTCAAAA
LHR-B extraction ROMO	792 AATATCGAGCTGAACCTTATAGGAGGAAGGATTTTCAGCTTATATCTCCAAGTCAAAA 851
U20504 (BTU20504)	2006 AUGGCUUCACUGG 2018 ATGGCTTCACTG
LHR-B extraction ROMO	852 ATGGCTTCACTGT 864.

Figura 5. Comparación entre la secuencia de la región codificante del fragmento LHR-B RS y la secuencia de referencia Bos tau-rus U20540 del Genebank. *Identities* = 792/2413 (32%), *Gaps* = 1620/2413 (67%).

que probablemente afecten la fertilidad de las hembras bovinas, los fragmentos obtenidos para la región codificante de los dominios extracelular y transmembrana del receptor para la hormona luteinizante en tejido folicular de las razas Romosinuano y Brahman permiten suponer que ante la presencia de las secuencias completas del mismo y sin adiciones, los animales

podrían presentar un desempeño reproductivo dentro de los parámetros fisiológicos normales.

Convendría realizar trabajos encaminados a la cuantificación de la expresión del gen y la determinación de los componentes celulares que lo expresan comparando animales de buen historial reproductivo con animales que presenten alteraciones en su normal ciclicidad ovárica o con problemas de fertilidad.

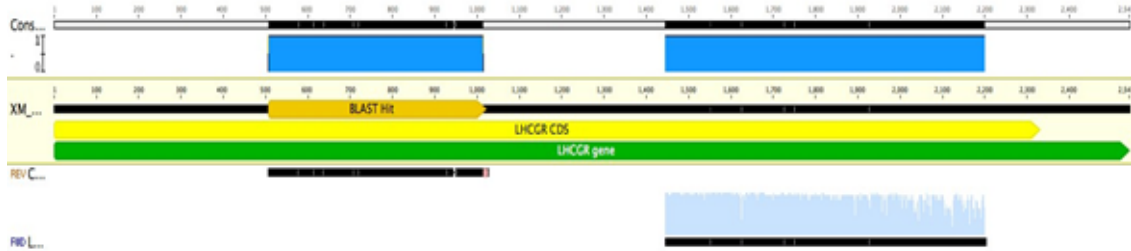


Figura 6. Representación gráfica de los fragmentos LHR-A y LHR-B secuenciados para la raza Br, sobre la región codificante XM_019969469 (Genbank). Software Geneious R8.

Consensus extraction	LHR-A2 BR	577 GCCTTTGACAACCTCCTCAATTTGTCTGAAATACTGATCCAGAACACTAAAAACCTGGTG 518 GCCTTTGACAACCTCCTCAATTTGTCTGAAATACTGATCCAGAACACTAAAAACCTGGTG
XM_019969469		508 GCCTTTGACAACCTCCTCAATTTGTCTGAAATACTGATCCAGAACACTAAAAACCTGGTG 567
Consensus extraction	LHR-A2 BR	517 CACATTGAGGCAGGAGCGTTTACAAATCTCCCTCGGTTAAAATACCTGAGCATCTGTAAT 458 CACATTGAGGC GGAGCGTTTACAAATCTCCCTCGGTTAAAATACCT AGCATCTGTAAT
XM_019969469		568 CACATTGAGGCTGGAGCGTTTACAAATCTCCCTCGGTTAAAATACCTAAGCATCTGTAAT 627
Consensus extraction	LHR-A2 BR	457 ACAGGCATCCACAAGCTTCCAGATGTTACGAAGATCTTCTCCTCTGAATTTAATTTTCATT 398 ACAGGCATCC+CAAGCTTCCAGATGTTACGAAGATCTTCTCCTCTGAATTTAATTTTCATT
XM_019969469		628 ACAGGCATCCRCAAGCTTCCAGATGTTACGAAGATCTTCTCCTCTGAATTTAATTTTCATT 687
Consensus extraction	LHR-A2 BR	397 CTGGAAATTTGTGATAACTTAGACATAACCACCATACCAAGAAATGCTTTTCAAGGGATG 338 CTGGAAATTTGTGATAACTTA ACATAACCACC+TACCAAGAAATGCTTTTCAAGGGATG
XM_019969469		688 CTGGAAATTTGTGATAACTTACACATAACCACRTACCAAGAAATGCTTTTCAAGGGATG 747
Consensus extraction	LHR-A2 BR Copy	337 AATAACGAATCCATAACGCTAAAACCTATATGGAAATGGATTGGAAGAAATACAAAGTCAT 278 AATAACGAATCCATAACGCTAAAACCTATATGGAAATGGATTGGAAGAAATACAAAGTCAT
XM_019969469		748 AATAACGAATCCATAACGCTAAAACCTATATGGAAATGGATTGGAAGAAATACAAAGTCAT 807
Consensus extraction	LHR-A2 BR Copy	277 GCATTCAATGGGACAACGCTGATTCCCTGGAGCTGAAGGAAAATGCACGCCTGGAGAAG 218 GCATTCAATGGGACAACGCTGATTCCCTGGAGCTGAAGGAAAATGCACGCCTGGAGAAG
XM_019969469		808 GCATTCAATGGGACAACGCTGATTCCCTGGAGCTGAAGGAAAATGCACGCCTGGAGAAG 867
Consensus extraction	LHR-A2 BR Copy	217 ATGCACAACGACGCCTTCCGGGGGGCCACGGGGCCTAGCATTTTGGATATTTCTTCCACT 158 ATGCACAACGACGCCTTCCGGGGGGCCACGGGGCCTAGCATTTTGGATATTTCTTCCACT
XM_019969469		868 ATGCACAACGACGCCTTCCGGGGGGCCACGGGGCCTAGCATTTTGGATATTTCTTCCACT 927
Consensus extraction	LHR-A2 BR Copy	157 AAACCTGCAGGCCCTGCC--CCTACGGGCTAGAGTCCATTAGACACTAATTGCCACATCA 100 +AACTGCAGGCCCTGCC CCTA+GGGCTAGAGTCCATTAGACACTAATTGCCACATCA
XM_019969469		928 MAACCTGCAGGCCCTGCCTACCTAYGGGCTAGAGTCCATTAGACACTAATTGCCACATCA 987
Consensus extraction	LHR-A2 BR	99 TCCTATTCTCTGAAAAAAGTCCATCGAGAGAAAAA 64 TCCTATTCTCTGAAAAAAGTCCATCGAGAGAAAAA
XM_019969469		988 TCCTATTCTCTGAAAAAAGTCCATCGAGAGAAAAA 1023

Figura 7. Comparación entre la secuencia de la región codificante del fragmento LHR-A Br y la secuencia de referencia Bos indicus >XM_019969469 del Genebank. *Identities* = 507/516 (98%), *Gaps* = 2/516 (0%).

LHR-B2_LHR-B_Primer_R.ab1 extraction	64 ACTTCTGCATGGGGCTCTACCTGCTGCTCATTGCCTCAGTCGATGCCAGACCAAAGGCC 123 ACTTCTGCATGGGGCTCTACCTGCTGCTCATTGCCTCAGTCGATGCCAGACCAAAGGCC
XM_019969469	1445 ACTTCTGCATGGGGCTCTACCTGCTGCTCATTGCCTCAGTCGATGCCAGACCAAAGGCC 1504
LHR-B2_LHR-B_Primer_R.ab1 SELECCIONADA extraction	124 AGTATTACAACCATGCCATAGACTGGCAGACAGGGAGTGGGTGCAGCGCGGCTGGCTTTT 183 AGTATTACAACCATGCCATAGACTGGCAGACAGGGAGTGGGTGCAGCG+GGCTGGCTTTT
XM_019969469	1505 AGTATTACAACCATGCCATAGACTGGCAGACAGGGAGTGGGTGCAGCGYGGCTGGCTTTT 1564
LHR-B2_LHR-B_Primer_R.ab1 SELECCIONADA extraction	184 TCACTGTGTTTGCAAGTGAAGTCTCTGTCTACACCCTCACAGTCATCACACTAGAAAGAT 243 TCACTGTGTTTGCAAGTGAAGTCTCTGTCTACACCCTCACAGTCATCACACTAGAAAGAT
XM_019969469	1565 TCACTGTGTTTGCAAGTGAAGTCTCTGTCTACACCCTCACAGTCATCACACTAGAAAGAT 1624
LHR-B2_LHR-B_Primer_R.ab1 SELECCIONADA extraction	244 GTCACACCATCACCTATGCTATTCAACTGGACCAAAAAGCTGCGACTGAAACATGCCATTC 303 G CACACCATCACCTATGCTATTCAACTGGACCAAAAAGCTGCGACTGAAACATGCCATTC
XM_019969469	1625 GGCACACCATCACCTATGCTATTCAACTGGACCAAAAAGCTGCGACTGAAACATGCCATTC 1684
LHR-B2_LHR-B_Primer_R.ab1 SELECCIONADA extraction	304 CAGTCATGCTCGGAGGATGGCTCTTTTCTACTCTCATTGCCGTGTGCCCTTTGTGGGTG 363 CAGTCATGCTCGGAGGATGGCTCTTTTCTACTCTCATTGCC+TGTTGCCTTTGTGGGTG
XM_019969469	1685 CAGTCATGCTCGGAGGATGGCTCTTTTCTACTCTCATTGCCRTGTTGCCCTTTGTGGGTG 1744
LHR-B2_LHR-B_Primer_R.ab1 SELECCIONADA extraction	364 TCAGCAATTACATGAAGGTCAGCATTGCTCCCATGGATGTGGAAAGCACTCTCTCAC 423 TCAGCA+TTACATGAAGGTCAGCATTGCTCCCATGGATGTGGAAAGCACTCTCTCAC
XM_019969469	1745 TCAGCARTTACATGAAGGTCAGCATTGCTCCCATGGATGTGGAAAGCACTCTCTCAC 1804
LHR-B2_LHR-B_Primer_R.ab1 SELECCIONADA extraction	424 AGGTCTACATCTTAACCATCCTGATTCTCAACGTGATGGCCTTCATCATCATTGTGCTT 483 AGGTCTACATCTTAACCATCCTGATTCTCAACGTGATGGCCTTCATCATCATTGTGCTT
XM_019969469	1805 AGGTCTACATCTTAACCATCCTGATTCTCAACGTGATGGCCTTCATCATCATTGTGCTT 1864
LHR-B2_LHR-B_Primer_R.ab1 SELECCIONADA extraction	484 GCTACATTAATAATTTATTTTGCAGTTCAAAATCCAGAGCTGATGGCTACCAACAAAGATA 543 GCTACATTAATAATTTATTTTGCAGTTCAAAATCCAGAGCTGATGGCTACCAACAAAGATA
XM_019969469	1865 GCTACATTAATAATTTATTTTGCAGTTCAAAATCCAGAGCTGATGGCTACCAACAAAGATA 1924
LHR-B2_LHR-B_Primer_R.ab1 SELECCIONADA extraction	544 CCAAGATTGCTAAGAAAATGGCAGTCTCATCTTACCGATTCACCTGCATGGCACCAA 603 C AAGATTGCTAAGAAAATGGCAGTCTCATCTTACCGATTCACCTGCATGGCACCAA
XM_019969469	1925 CAAAGATTGCTAAGAAAATGGCAGTCTCATCTTACCGATTCACCTGCATGGCACCAA 1984
LHR-B2_LHR-B_Primer_R.ab1 SELECCIONADA extraction	604 TCTCTTTCTTTGCCATCTCAGCTGCCTTCAAAGTGCCCTCATTACAGTAACCAACTCAA 663 TCTCTTTCTTTGCCATCTCAGCTGCCTTCAAAGTGCCCTCATTACAGTAACCAACTCAA
XM_019969469	1985 TCTCTTTCTTTGCCATCTCAGCTGCCTTCAAAGTGCCCTCATTACAGTAACCAACTCAA 2044
LHR-B2_LHR-B_Primer_R.ab1 SELECCIONADA extraction	664 AGGTTCTACTGGTTCTCTTTATCCTGTCAATTCATGCGCCAATCCGTTTCTGTACGCAA 723 AGGTTCTACTGGTTCTCTTTATCCTGTCAATTCATGCGCCAATCCGTTTCTGTACGCAA
XM_019969469	2045 AGGTTCTACTGGTTCTCTTTATCCTGTCAATTCATGCGCCAATCCGTTTCTGTACGCAA 2104
LHR-B2_LHR-B_Primer_R.ab1 SELECCIONADA extraction	724 TTTTCACAAAGGCATTCCAAAGGGATTCTTTCTGTTGCTGAGCAAATTTGGCTGCTGTA 783 TTTTCACAAAGGCATTCCAAAGGGATTCTTTCTGTTGCTGAGCAAATTTGGCTGCTGTA
XM_019969469	2105 TTTTCACAAAGGCATTCCAAAGGGATTCTTTCTGTTGCTGAGCAAATTTGGCTGCTGTA 2164
LHR-B2_LHR-B_Primer_R.ab1 SELECCIONADA extraction	784 AATATCGAGCTGAACTTTATAGGAGGAAGGATTTT 819 AATATCGAGCTGAACTTTATAGGAGGAAGGATTTT
XM_019969469	2165 AATATCGAGCTGAACTTTATAGGAGGAAGGATTTT 2200

Figura 8. Comparación entre la secuencia de la región codificante del fragmento LHR-B Br y la secuencia de referencia *Bos indicus* >XM_019969469 del Genebank. *Identities* = 751/756 (99%), *Gaps* = 0/756 (0%).

Referencias

- Cadagan D, Towlson C. Mechanisms of Luteinising Hormone Regulation in Female Steroidogenesis. *Am J Med*, 2017;5:65-68.
- Casarini L, Pignatti E, Simoni M. Effects of polymorphisms in gonadotropin and gonadotropin receptor genes on reproductive function. *Rev Endocr Metab Dis*, 2011;12:303.
- Clelland E, Peng C. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. *Mol Cell Endocrinol*, 2009;312:42-52.
- Delemi A. Identificación de la expresión level to LH-r Gene in dominant and cystic ovarian follicles cells of the cow.
- Al-Delemi DHJ, Al-Gewary AKA, Ali Jeddoia Z. Identification of the expression level to LH-r gene in dominant and cystic ovarian follicles cells of the cows. *J Dairy Vet Anim Res*, 2014;1(3):80-86. DOI: 10.15406/jdvar.2014.01.00017
- Dickinson RE, Stewart AJ, Myers M, Millar RP, Duncan WC. Differential expression and functional characterization of luteinizing hormone receptor splice variants in human luteal cells: implications for luteolysis. *Endocrinology*, 2009;150:2873-2881.
- Gay V, Midgley Jr A, Niswender G. (1970). Patterns of gonadotrophin secretion associated with ovulation. Federation proceedings, p. 1880.
- Ginther O. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci*, 2000;60:61-79.
- Hastings N, Donn S, Derecka K, Flint A, Woolliams J. Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. *Anim Genet*, 2006;37:583-585.
- Holdridge LR. 1967. Life zone ecology. Life zone ecology.
- Johnson A, Bridgham J, Wagner B. Characterization of a chicken luteinizing hormone receptor (cLH-R) complementary deoxyribonucleic acid, and expression of cLH-R messenger ribonucleic acid in the ovary. *Biol Reprod*, 1996;55: 304-309.
- Kawate N. Studies on the regulation of expression of luteinizing hormone receptor in the ovary and the mechanism of follicular cyst formation in ruminants. *J Reprod Develop*, 2004;50:1-8.
- Larsson B. Determination of Ovulation by Ultrasound Examination and its Relation to the LH-Peak in Heifers. *J Vet Med A*, 1987;34:749-754.
- Liu KC, Lin SW, Ge W. Differential regulation of gonadotropin receptors (fshr and lhcr) by estradiol in the zebrafish ovary involves nuclear estrogen receptors that are likely located on the plasma membrane. *Endocrinology*, 2011;152:4418-4430.
- Ma T, Xiong Q, Yuan B, Jiang H, Gao Y, Xu J, Liu S, et al. Luteinizing hormone receptor splicing variants in bovine Leydig cells. *Genet Mol Res*, 2012;11:1721-1730.
- Mamluk R, Wolfenson D, Meidan R. LH receptor mRNA and cytochrome P450 side-chain cleavage expression in bovine theca and granulosa cells luteinized by LH or forskolin. *Domest Anim Endocrinol*, 1998;15:103-114.
- McArdle C, Roberson M. Gonadotropes and gonadotropin-releasing hormone signaling. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 2015;4:335-397.
- Nejad SZ, Tehrani FR, Zadeh-Vakili A. The Role of Kisspeptin in Female Reproduction. *Int J Endocrinol Metab*, 2017;15(3):e44337. doi: 10.5812/ijem.44337.
- Nogueira M, Buratini J, Price C, Castilho A, Pinto M, Barros C. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Mol Reprod Dev*, 2007;74: 680-686.
- Peiró JR, Nogueira GM, Nogueira GP, Perri SH, Cardoso D. Ovariectomy by left flank approach in prepubertal Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Can J Vet Res*, 2009;73:237-240.
- Pierson R, Ginther O. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology*, 1988;29:21-37.
- Rawan A, Yoshioka S, Abe H, Acosta T. Insulin-Like Growth Factor-1 Regulates the Expression of Luteinizing Hormone Receptor and Steroid Production in Bovine Granulosa Cells. *Reprod Domest Anim*, 2015;50:283-291.
- Richards J, Hedin L. Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Annu Rev Physiol*, 1988;50: 441-463.
- Robert C, Gagne D, Lussier J, Bousquet D, Barnes F, Sirard M. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. *Reproduction*, 2003;125:437-446.
- Senger (2012). Pathways to pregnancy and parturition. 3th ed. Redmond: Current Conceptions. Inc., p.102.

Álvaro Vejarano: <http://orcid.org/0000-0002-2476-8255>
Aureliano Hernández: <http://orcid.org/0000-0003-0829-5336>
lang Rondón: <https://orcid.org/0000-0001-6980-892X>
Rafael Suárez: <https://orcid.org/0000-0003-1092-164X>