



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

## **POLIMORFISMOS DE LOS GENES *GDF9*, *BMP15* Y *BMPR-IB* Y SU INFLUENCIA EN VARIABLES REPRODUCTIVAS EN OVEJAS PELIBUEY**

CANUTO MUÑOZ GARCÍA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

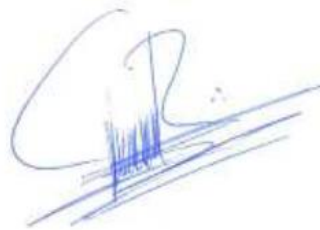
MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2020

La presente tesis titulada: **Polimorfismos de los genes *GDF9*, *BMP15* y *BMPR-IB* y su influencia en variables reproductivas en ovejas Pelibuey**, realizada por el alumno: **Canuto Muñoz García**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

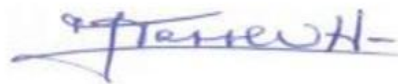
DOCTOR EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR



CONSEJERO

DR. CÉSAR CORTEZ ROMERO



ASESOR

DR. GLAFIRO TORRES HERNÁNDEZ



ASESOR

DR. JAIME GALLEGOS SÁNCHEZ



ASESOR

DR. JUAN MANUEL CUCA GARCÍA



ASESOR

DR. JUAN SALAZAR ORTÍZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, septiembre de 2020

# **POLIMORFISMOS DE LOS GENES GDF9, BMP15 Y BMPR-1B Y SU INFLUENCIA EN VARIABLES REPRODUCTIVAS EN OVEJAS PELIBUEY**

**Canuto Muñoz García, D.C.  
Colegio de Postgrados, 2020**

## **RESUMEN**

La especie ovina presenta gran variabilidad genética, a nivel inter- e intra- raza, en las variables reproductivas tasa ovulatoria y prolificidad; y entender las causas que originan que estas variables sean elevadas en algunas razas ovinas prolíficas, ha permitido identificar a los genes de la fecundidad que participan en la función ovárica. Estos genes pertenecen a la familia del factor de crecimiento transformante tipo  $\beta$  (TGF  $\beta$ ); tales como la proteína morfogénica ósea 15 (*BMP15*), el factor de crecimiento y diferenciación 9 (*GDF9*) y el receptor de la proteína morfogénica ósea tipo 1B (*BMPR1B*). En México, la oveja Pelibuey es la raza de pelo de mayor distribución, no obstante, tiene gran variabilidad en tasa ovulatoria y prolificidad por lo que es necesario realizar estudios de estos genes que están relacionados con estas variables reproductivas. Así, los objetivos de esta investigación fueron amplificar los genes *BMP15* y *GDF9*, buscar sus polimorfismos, clasificar a las ovejas de acuerdo a su genotipo, determinar la relación de los polimorfismos con tipo de parto y medir tasa ovulatoria y prolificidad de acuerdo al polimorfismo que tiene influencia en estas variables reproductivas en ovejas Pelibuey. Eva Las secuencias de *BMP15* y *GDF9* se obtuvieron de muestras sanguíneas recolectadas en tarjetas Whatman™ FTA™ de 94 ovejas Pelibuey multíparas con registros reproductivos. Se analizó la calidad de las secuencias, se realizó su alineamiento y se hizo el análisis de polimorfismo. El 70.2% de las ovejas amplificaron *BMP15* y *GDF9*. El análisis de polimorfismo a nivel de nucleótidos en los exones 1 y 2 de *BMP15* no fue diferente y, en el exón 2 de *GDF9* se identificaron los polimorfismos *G2*, *G3*, *G4*, *G5*, *G6* y *FecG<sup>E</sup>*; de estos, *G2*, *G3* y *G5* son mutaciones sinónimas, en tanto que *G4*, *G6* y *FecG<sup>E</sup>* son mutaciones no sinónimas y de éstas sus genotipos no tuvieron relación con el tipo de parto. El polimorfismo que tuvo efecto en las variables reproductivas fue *FecG<sup>E</sup>* y de este, las ovejas del genotipo mutado GG tuvieron 1.2 y 1.7

más cuerpos lúteos y 0.8 y 1.0 más corderos por oveja, que el genotipo silvestre AA y grupo sG, respectivamente.

Palabras clave: secuencias, alineamiento, genotipos, manejo reproductivo

# **POLIMORFISMOS DE LOS GENES GDF9, BMP15 Y BMPR-1B Y SU INFLUENCIA EN VARIABLES REPRODUCTIVAS EN OVEJAS PELIBUEY**

**Canuto Muñoz García, D.C.  
Colegio de Postgraduados, 2020**

## **ABSTRACT**

The ovine species presents great genetic variability, at the inter- and intra-breed level, in the reproductive variables, ovulation rate and prolificacy; and understanding the causes that cause these variables to be elevated in some prolific sheep breeds, has made it possible to identify the fertility genes that participate in ovarian function. These genes belong to the family of transforming growth factor type- $\beta$  (TGF $\beta$ ); such as bone morphogenic protein 15 (BMP15), growth and differentiation factor 9 (GDF9), and bone morphogenic protein receptor type 1B (BMPR1B). In Mexico, the Pelibuey sheep is the most widely distributed hair breed, however, it has great variability in ovulatory rate and prolificacy, so it is necessary to carry out studies of these genes that are related to these reproductive variables. Thus, the objectives of this research were to amplify the BMP15 and GDF9 genes, search for their polymorphisms, classify ewes according to their genotype, determine the relationship of polymorphisms with type of parturition and measure ovulation rate and prolificacy according to the polymorphism that has an influence on these reproductive variables in Pelibuey sheep. The BMP15 and GDF9 sequences were obtained from blood samples collected on Whatman<sup>TM</sup> FTA<sup>TM</sup> cards from 94 multiparous Pelibuey sheep with reproductive records. The quality of the sequences was analyzed, their alignment was carried out and the polymorphism analysis was carried out. 70.2% of the sheep amplified BMP15 and GDF9. The analysis of polymorphism at the nucleotide level in exons 1 and 2 of BMP15 was not different and, in exon 2 of GDF9, polymorphisms G2, G3, G4, G5, G6 and FecG<sup>E</sup> were identified; of these, G2, G3 and G5 are synonymous mutations, while G4, G6 and FecG<sup>E</sup> are non-synonymous mutations and of these their genotypes were not related to the type of delivery. The polymorphism that had an effect on the reproductive variables was FecG<sup>E</sup> and from this, the sheep of the

mutated GG genotype had 1.2 and 1.7 more corpora lutea and 0.8 and 1.0 more lambs per sheep, than the wild genotype AA and group sG, respectively.

Keywords: sequences, alignment, genotypes, reproductive management

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el financiamiento otorgado para la realización de mis estudios de doctorado.

Al **Colegio de Postgraduados** por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado.

A la **Unidad de Producción Agropecuaria “El Gargaleote”** de la Universidad Autónoma Chapingo por la facilitación de las ovejas para realizar mi investigación.

Al **Laboratorio de uso común de Biología Molecular** del Posgrado de Fitosanidad, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados.

Al **Dr. César CORTEZ ROMERO** por la dirección de esta tesis, tiempo dedicado a la revisión de esta investigación, comentarios emitidos y observaciones realizadas para la realización de esta tesis.

A la **Dra. Obdulia Lourdes Segura León** por su aportación en la fase del Laboratorio de Biología Molecular y por sus comentarios acertados en el análisis bioinformático de esta tesis.

Al **Dr. Glafiro Torres Hernández** por su contribución en la realización de este estudio, tiempo, dedicación y sus valiosas observaciones en la redacción de esta tesis.

Al **Dr. Jaime GALLEGOS SÁNCHEZ** por sus enseñanzas, comentarios y aportaciones valiosas en la realización de esta tesis, por su apoyo y confianza.

Al **Dr. Humberto VAQUERA HUERTA** por sus enseñanzas, gran apoyo en el análisis estadístico de esta investigación y por su amistad brindada.

Al **Dr. Juan MANUEL CUCA GARCÍA** por sus enseñanzas y observaciones realizadas para la realización de esta tesis.

Al **Dr. Juan SALAZAR ORTIZ** por sus comentarios emitidos y observaciones realizadas para la realización de esta tesis.

## DEDICATORIA

A **Dios** por permitirme llegar a este momento y darme la oportunidad de cumplir una meta más en la vida.

A **mis padres**, el Sr. **Eugenio Muñoz Mendoza** y la Sra. **Modesta García Mundo** por darme la vida. A mi padre por su inigualable ejemplo, sus valiosos consejos, por su lucha y tenacidad. A mi madre por su gran comprensión y consejos. A los dos por su gran apoyo y creer en mí.

A mi querida **esposa Leticia** gracias por ser el amor de mi vida y ser una gran compañera, por su gran apoyo en los momentos buenos y malos de vida. Gracias por tu comprensión e inigualable amor.

A **mis hijos Mary Carmen** y **Marco Manuel** por ser el gran motor de mi vida, ya que a su llegada a este mundo cambiaron nuestras vidas, son nuestra piedra angular que nos motiva e impulsa a seguir a delante. Gracias.

A **mis hermanos Ángel, Salvador, Ma. Estela, Reynaldo y Wilber** por su comprensión, gran apoyo y aparte de ser mis hermanos son mis amigos. Gracias por sus consejos.



## CONTENIDO

|   |      |
|---|------|
| <b>RESUMEN</b> .....  | iii  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | v    |
| <b>LISTA DE CUADROS</b> .....   | xiii |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....   | xiv  |
| <b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....   | 1    |
| Literatura citada .....   | 3    |
| <b>CAPÍTULO 1. FUNCIÓN DE GENES DE LA FECUNDIDAD EN TASA<br/>OVULATORIA Y TAMAÑO DE LA CAMADA EN OVEJAS</b> .....                   | 5    |
| <b>1.1 RESUMEN</b> .....  | 5    |
| <b>1.2 ABSTRACT</b> .....   | 6    |
| <b>1.3 INTRODUCCIÓN</b> .....   | 7    |
| <b>1.4 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | 8    |
| <b>1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....   | 8    |
| 1.5.1 Gen GDF9 .....  | 8    |
| 1.5.2 Gen BMP15 .....   | 11   |
| 1.5.3 Receptor del gen BMPR-1B.....   | 13   |
| <b>1.6 CONCLUSIONES</b> .....   | 20   |
| <b>1.7 LITERATURA CITADA</b> .....  | 21   |
| <b>CAPÍTULO 2. ANÁLISIS DE LOS GENES <i>BMP15</i> Y <i>GDF9</i> Y SU RELACIÓN CON<br/>EL TIPO DE PARTO EN OVEJAS PELIBUEY</b> ..... | 27   |
| <b>2.1 RESUMEN</b> .....  | 27   |
| <b>2.2 ABSTRACT</b> .....   | 28   |
| <b>2.3 INTRODUCCIÓN</b> .....   | 29   |
| <b>2.4 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | 31   |
| 2.4.1 Ubicación y ovejas .....  | 31   |
| 2.4.2 Recolección y conservación de muestras .....  | 31   |
| 2.4.3 Procesamiento de muestras.....  | 32   |
| 2.4.4 Amplificación de genes BMP15 y GDF9 .....   | 32   |
| 2.4.5 Secuenciación de DNA .....  | 33   |
| 2.4.6 Análisis bioinformático de secuencias.....  | 34   |

|  |  |           |
|--|--|-----------|
| 2.4.7  | Análisis estadístico.....  | 34        |
| <b>2.5</b>   | <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>35</b> |
| 2.5.1  | Presencia de los genes BMP15 y GDF9 .....  | 35        |
| 2.5.2  | Los genes BMP15 y GDF9 y su relación con el tipo de parto .....  | 35        |
| 2.5.3  | Análisis de secuencias de los genes BMP15 y GDF9 .....   | 36        |
| 2.5.4  | Búsqueda de polimorfismos en los genes BMP15 y GDF9.....   | 36        |
| 2.5.5  | Análisis de polimorfismos en el gen GDF9.....  | 37        |
| 2.5.6  | Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos G4, G6 y<br>FecGE en el exón 2 del gen GDF9 y su relación con el tipo de parto ..... | 38        |
| 2.5.7  | Modelado de las proteínas de los genes BMP15 y GDF9.....   | 40        |
| <b>2.6</b>   | <b>DISCUSIÓN</b> .....   | <b>41</b> |
| <b>2.7</b>   | <b>CONCLUSIONES</b> .....  | <b>45</b> |
| <b>2.8</b>   | <b>LITERATURA CITADA</b> .....   | <b>45</b> |
| <b>CAPÍTULO 3 GENOTIPOS DEL POLIMORFISMO <i>FecGE</i> Y SU INFLUENCIA EN<br/>LA RESPUESTA REPRODUCTIVA DE OVEJAS PELIBUEY EN LA ÉPOCA DE<br/>ANESTRO</b> ..... |  |           |
|  |  | <b>51</b> |
| <b>3.1</b>   | <b>RESUMEN</b> .....   | <b>51</b> |
| <b>3.2</b>   | <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>52</b> |
| <b>3.3</b>   | <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>53</b> |
| <b>3.4</b>   | <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | <b>55</b> |
| 3.4.1  | Ubicación, ovejas y alimentación .....   | 55        |
| 3.4.2  | Procesamiento de muestras y secuenciación .....  | 56        |
| 3.4.3  | Análisis bioinformático de secuencias y genotipado .....   | 57        |
| 3.4.4  | Manejo sanitario.....  | 58        |
| 3.4.5  | Inducción y sincronización del estro y ovulación .....   | 58        |
| 3.4.6  | Detección de estros, monta natural controlada y retorno a estro .....  | 59        |
| 3.4.7  | Tasa ovulatoria .....  | 59        |
| 3.4.8  | Gestación .....  | 60        |
| 3.4.9  | Parición .....   | 60        |
| 3.4.10   | Prolificidad.....  | 60        |
| 3.4.11   | Fecundidad .....   | 60        |

|  |   |           |
|--|---|-----------|
| 3.4.12   | Análisis estadístico.....   | 60        |
| <b>3.5</b>   | <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>61</b> |
| 3.5.1  | Incidencia y retorno al estro .....   | 61        |
| 3.5.2  | Tasa ovulatoria.....  | 61        |
| 3.5.3  | Porcentaje de gestación y parición.....   | 62        |
| 3.5.4  | Prolifidad y fecundidad .....   | 63        |
| <b>3.6</b>   | <b>DISCUSIÓN</b> .....  | <b>63</b> |
| <b>3.7</b>   | <b>CONCLUSIONES</b> .....   | <b>67</b> |
| <b>3.8</b>   | <b>LITERATURA CITADA</b> .....  | <b>68</b> |
| <b>CAPÍTULO 4. POLIMORFISMOS Y GENOTIPOS EN <i>GDF9</i> Y <i>BMP15</i> MEDIANTE EL SISTEMA DE AMPLIFICACIÓN REFRACTARIA DE MUTACIONES CON TETRA-INICIADORES EN OVEJAS PELIBUEY .....</b> |   |           |
| <b>4.1</b>   | <b>RESUMEN</b> .....  | <b>73</b> |
| <b>4.2</b>   | <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>74</b> |
| <b>4.3</b>   | <b>INTRODUCCIÓN</b> .....   | <b>75</b> |
| <b>4.4</b>   | <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | <b>77</b> |
| 4.4.1  | Ubicación y ovejas .....  | 77        |
| 4.4.2  | Recolección y conservación de muestras .....  | 77        |
| 4.4.3  | Procesamiento de muestras.....  | 78        |
| 4.4.4  | Polimorfismos y genotipos en los genes <i>BMP15</i> y <i>GDF9</i> por T-ARMS-PCR.....           | 78        |
| 4.4.5  | Polimorfismos y genotipos en los genes <i>GDF9</i> y <i>BMP15</i> por PCR y secuenciación ..... | 81        |
| 4.4.6  | Análisis bioinformático de secuencias.....  | 82        |
| <b>4.5</b>   | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....   | <b>83</b> |
| 4.5.1  | Polimorfismos y genotipos en los genes <i>GDF9</i> y <i>BMP15</i> por T-ARMS-PCR.....           | 83        |
| 4.5.2  | Polimorfismos y genotipos en los genes <i>GDF9</i> y <i>BMP15</i> por secuenciación .....       | 84        |
| <b>4.6</b>   | <b>CONCLUSIÓN</b> .....   | <b>87</b> |
| <b>4.7</b>   | <b>LITERATURA CITADA</b> .....  | <b>87</b> |

**CONCLUSIONES GENERALES ..... 91**

## LISTA DE CUADROS

|   |    |
|---|----|
| Cuadro 1. Polimorfismos o mutaciones puntuales en genes de la fecundidad BMPR-1B, BMP15 y GDF9 en razas de ovinos prolíficas a nivel mundial.....                                       | 17 |
| Cuadro 2. Análisis de polimorfismos y prueba de neutralidad de Tajima (D) del exón 2 del gen GDF9 y su relación con el tipo de parto en ovejas Pelibuey.....                            | 38 |
| Cuadro 3. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos G4, G6 y FecG <sup>E</sup> del exón 2 del gen GDF9 y su relación con el tipo de parto en ovejas Pelibuey.....         | 39 |
| Cuadro 4. Incidencia y retorno al estro en los genotipos del polimorfismo FecG <sup>E</sup> en el gen GDF9 en ovejas Pelibuey.....  | 61 |
| Cuadro 5. Porcentaje de gestación y parición en los genotipos del polimorfismo FecG <sup>E</sup> del gen GDF9 en ovejas Pelibuey.....   | 62 |
| Cuadro 6. Prolificidad y fecundidad en los genotipos del polimorfismo FecG <sup>E</sup> del gen GDF9 en ovejas Pelibuey (Media±E.E.).....   | 63 |
| Cuadro 7. Secuencias utilizadas para amplificar e identificar los polimorfismos y sus genotipos de los genes GDF9 y BMP15 en ovejas Pelibuey mediante la metodología de T-ARSM-PCR..... | 80 |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representación esquemática de señalización parácrina entre el ovocito y las células de la granulosa. Imagen modificada de Gilchrist et al. (2008) y Myers y Pangas (2010)..... 16
- Figura 2. Amplificación del exón 2 (a) del gen GDF9, exón 1 (b) y exón 2 (c) del gen BMP15 en ovejas Pelibuey; a) carril 1: MM= marcador molecular, 2: testigo negativo y carriles 3-12 muestras; b) carril 1: MM, carriles 2-13 muestras y carril 14: testigo negativo; c) carril 1: MM, carriles 2-9 muestras y carril 10: testigo negativo. .... 35
- Figura 3. Los polimorfismos G2, G3 y G5 (sin cambio) y G4, G6 y FecG<sup>E</sup> (con cambio) en el exón 2 del gen GDF9 en ovejas Pelibuey. Secs. = secuencias, Gs = parto simple, Gd= parto doble, GT = parto triple, G4 = ácido glutámico por lisina (E →K), G6 = valina por isoleucina (V →I) y FecG<sup>E</sup> (GE) = fenilalanina por cisteína (F →C). .... 37
- Figura 4. Modelado de las proteínas sin procesar de los genes BMP15 (a) y GDF9 (b) en ovejas Pelibuey. .... 40
- Figura 5. Temperatura (°C) y humedad relativa (%) registradas en el área de estudio durante la investigación: 25 de mayo (día 1) a 7 de junio (día 14). .... 56
- Figura 6. Tasa ovulatoria en los genotipos del polimorfismo FecG<sup>E</sup> del gen GDF9 en ovejas Pelibuey (Media ± E.E.). <sup>a, b</sup> Letra diferente en las barras, indica diferencia (p<0.05). CL = cuerpos lúteos GG = Embrapa, AA = Silvestre y sG = sin gen. E.E. = error estándar. .... 62
- Figura 7. Polimorfismos y genotipos en los genes GDF9 y BMP15 por T-ARSM-PCR en ovejas Pelibuey. (MM= marcador molecular). Polimorfismo G4 con sus genotipos; a) silvestre (carriles 1 a 5: ovejas con fragmento de 261 pb y testigo 417 pb) y b) mutado (carriles 6 a 9: ovejas con fragmento de 212 pb). Polimorfismo G6 con sus genotipos c) silvestre (carriles 10 a 13: ovejas con fragmento de 223 pb y testigo 362 pb) y d) mutado (carriles 14 a 17: ovejas con fragmento de 193 pb). Polimorfismo FecX<sup>G</sup>

en su forma e) silvestre (carriles 18 a 22: ovejas con fragmento de 102 pb, testigo 158 pb) y FecX<sup>L</sup> en su forma f) silvestre (carriles 23 a 27: ovejas con fragmento de 252 pb). ..... 83

Figura 8. Electroferogramas de los SNP G4 y G6 obtenidos por secuenciación del exón 2 del gen GDF9 en ovejas Pelibuey. El polimorfismo G4 con sus genotipos a) silvestre y b) mutado y G6 con sus genotipos c) silvestre y d) mutado. En el gen BMP15 no se encontraron SNP. .... 84

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La rentabilidad de una unidad de producción ovina depende entre otras cosas de la capacidad reproductiva de las ovejas, la cual se puede medir a través de la fertilidad y prolificidad (Abdoli *et al.* 2016); de la habilidad de mantener elevada esta última característica reproductiva dependerá la rentabilidad de la unidad de producción (Liu *et al.* 2014). No obstante, las diferentes razas ovinas en el mundo presentan grandes diferencias en la tasa ovulatoria y prolificidad (Hanrahan *et al.* 2004; Davis 2005; Fabre *et al.* 2006). Las investigaciones realizadas en torno al control genético en ovinos han reportado que la tasa ovulatoria y prolificidad están reguladas por genes con efecto mayor, ya sea de forma individual o en conjunto, que afectan la función ovárica (Hanrahan *et al.* 2004; Davis 2005; Fabre *et al.* 2006). Debido a que la especie ovina presenta gran variabilidad en las características reproductivas tasa ovulatoria y prolificidad, la oveja se proyecta como un modelo animal adecuado para estudiar las causas genéticas que originan esta variabilidad; así como, para entender los mecanismos intra-ováricos implicados en su regulación (Fabre *et al.* 2006; Liu *et al.* 2014).

Uno de los primeros trabajos que reportaron una gran tasa ovulatoria (promedio 4.2) y una elevada prolificidad (promedio 2.5 corderos por oveja) en ovejas Booroola Merino australiana fueron Piper y Bidon (1980) y Bindon (1984), quienes por primera vez mencionaron que la gran tasa ovulatoria y prolificidad podrían ser debidas a la acción de un solo gen o genes que se expresan en el ovario para la maduración de una gran cantidad de folículos. Posteriormente, en el 2001 descubrieron que la causante del



fenotipo de híper-prolificidad en la oveja Merino Booroola fue la mutación del receptor de la proteína morfogénica ósea (*BMPR-IB*) (Mulsant *et al.* 2001; Souza *et al.* 2001; Wilson *et al.* 2001). Así mismo, Galloway *et al.* (2000) quienes trabajaron con ovejas Romney, reportaron una mutación en el gen de la proteína morfogénica ósea 15 (*BMP15*) y la señalaron como la responsable del fenotipo híper-prolífico en esta raza. Después, Hanrahan *et al.* (2004) reportaron que una mutación encontrada en el factor de crecimiento y diferenciación nueve (*GDF9*) era la responsable de la gran tasa ovulatoria y prolificidad en ovejas Belclare y Cambridge. Debido al efecto que presentan estos genes en la tasa ovulatoria y prolificidad se les han denominado genes de la fecundidad o *Fec* y pertenecen a la súper familia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Davis 2005; Fabre *et al.* 2006). Esta familia incluye las proteínas morfogénicas óseas (BMP), factores de crecimiento (GF), entre otras. Tanto las proteínas morfogénicas como los factores del crecimiento se expresan en el ovario y son fundamentales para la función ovárica (Chang *et al.* 2016); específicamente, los genes *GDF9*, *BMP15* y *BMPR-IB* participan en todas las etapas del desarrollo folicular (Hanrahan *et al.* 2004; Strauss y Williams 2019), madurez de los folículos y ovulación, entre otras funciones (Paulini y Melo 2011). A pesar de haber un gran avance en el descubrimiento de BMP y GF, en la actualidad el entendimiento de los procesos involucrados en la señalización intra ovárica que regulan el número de ovocitos a ovular están en proceso de ser dilucidados (Paulini y Melo 2011).

Recientemente, diversos estudios han reportado algunas mutaciones en ovejas prolíficas, por ejemplo, en el gen *BMP15* se han reportado nueve mutaciones puntuales

y en el gen *GDF9* se han reportado 11 mutaciones en las regiones codificantes de estos genes, los cuales se abordarán en los siguientes capítulos de esta tesis.

La oveja Pelibuey es la raza de pelo de mayor distribución en México y tiene gran variabilidad en tasa ovulatoria y prolificidad; debido a esto es necesario realizar estudios de control genético de los genes relacionados con estas variables reproductivas. Por lo que el objetivo general de este trabajo fue amplificar los genes *BMP15* y *GDF9*, buscar sus polimorfismos, agrupar las ovejas de acuerdo a su genotipo y determinar la relación de los polimorfismos con variables reproductivas en ovejas Pelibuey.

#### Literatura citada

- Abdoli, R., Zamani, P., Mirhoseini, S. Z., Ghavi Hossein-Zadeh, N., & Nadri, S. (2016). A review on prolificacy genes in sheep. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 51(5), 631–637. <https://doi.org/10.1111/rda.12733>
- Bindon, B. M. (1984). Reproductive biology of the Booroola Merino sheep. *Aust. J. Biol. Sci.*, 37, 163–190. <https://doi.org/10.1071/bi9840163>
- Chang, H. M., Qiao, J., & Leung, P. C. K. (2016). Oocyte-somatic cell interactions in the human ovary-novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Human Reproduction Update*, 23(1), 1–18. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw039>
- Davis, G. H. (2005). Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*, 37 Suppl 1, S11–S23. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-37-S1-S11>
- Fabre, S., Pierre, A., Mulsant, P., Bodin, L., Di Pasquale, E., Persani, L., ... Monniaux, D. (2006). Regulation of ovulation rate in mammals: Contribution of sheep genetic models. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-20>
- Galloway, S. M., McNatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P. E., Juengel, J. L., Jokiranta, T. S., ... Ritvos, O. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (*BMP15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, 25(3), 279–283. <https://doi.org/10.1038 / 77033>
- Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R., &

- Galloway, S. M. (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 70(4), 900–909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023093>
- Liu, Q., Pan, Z., Wang, X., Hu, W., Di, R., Yao, Y., & Chu, M. (2014). Progress on major genes for high fecundity in ewes. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 1(4), 282–290. <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2014042>
- Mulsant, P., Lecerf, F., Fabre, S., Schibler, L., Monget, P., Lanneluc, I., ... Elsen, J.-M. (2001). Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérimo ewes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(9), 5104–5109. <https://doi.org/10.1073/pnas.091577598>
- Paulini, F., & Melo, E. O. (2011). The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(2), 354–361. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01739.x>
- Piper, L. R., & Bidon, B. M. (1980). The Booroola Merino and the performance of médium non-peppin crosses at Armidale. In N. R. D. Piper L.R., Bindon B.M. (Ed.), *The Booroola Merino, Proceedings of a Workshop, Armidale (Vol. 23, pp. 9–19)*. CSIRO, Armidale, Australia.
- Souza, C. J. H., MacDougall, C., Campbell, B. K., McNeilly, A. S., & Baird, D. T. (2001). The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. *Journal of Endocrinology*, 169(2), R1–R6. <https://doi.org/10.1677/joe.0.169R001>
- Strauss, J. F., & Williams, C. J. (2019). Ovarian Life Cycle. In J. S. R. B. A. Gargiulo (Ed.), *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management: Eighth Edition (Eighth Edi, pp. 167-205.e9)*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00008-1>
- Wilson, T., Wu, X., Juengel, L. J., Ross, K. I., Lumsden, M. J., Lord, A. E., ... Montgomery, W. G. (2001). Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor ( ALK-6 ) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 64(4), 1225–1235. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.4.1225>

# CAPÍTULO 1. FUNCIÓN DE GENES DE LA FECUNDIDAD EN TASA OVULATORIA Y TAMAÑO DE LA CAMADA EN OVEJAS

## 1.1 RESUMEN

Entender las causas que originan tasas ovulatorias y de prolificidad altas, en algunas razas de ovinos, ha permitido identificar a los genes de la fecundidad que participan en la función ovárica. Esta revisión tuvo como objetivo describir la función de los genes *GDF9*, *BMP15* y *BMPR-1B* en la tasa ovulatoria y prolificidad de ovejas. En los genes de la fecundidad, se tiene el Factor de Crecimiento y Diferenciación 9 (*GDF9*), la Proteína Morfogénica Ósea 15 (*BMP15*) y el receptor de la Proteína Morfogénica Ósea tipo 1B (*BMPR1B*), los cuales pertenecen a la familia del Factor de Crecimiento Transformante tipo  $\beta$  (TGF $\beta$ ). En la mayoría de las mutaciones encontradas en las regiones codificantes de estos genes, las ovejas heterocigotas presentan un aumento en tasa ovulatoria y prolificidad; por el contrario, las ovejas homocigotas son infértiles. No obstante, algunas razas de ovinos con doble copia mutada u homocigotas presentan tasas ovulatorias y prolificidad altas. Estas variantes genéticas encontradas en los genes de fecundidad relacionadas con tasa ovulatoria y prolificidad en la oveja, representan una gran utilidad en la implementación de programas de mejoramiento genético, dirigidos a mejorar la eficiencia reproductiva y rentabilidad de los rebaños.

Palabras clave: Genes, *GDF9*, *BMP15*, *BMPR1B*, fecundidad.

## 1.2 ABSTRACT

Understanding the causes that originate high ovulatory and prolificacy rates, in some sheep breeds, has allowed us to identify the fecundity genes that participate in the ovarian function. This review aimed to describe the role of the *GDF9*, *BMP15* and *BMPR-1B* genes on ovulatory rates and prolificacy in sheep. In the fecundity genes, it is included the Growth and Differentiation Factor 9 (*GDF9*), Bone Morphogenic Protein 15 (*BMP15*) and Bone Morphogenic Protein receptor type 1B (*BMPR1B*), which belong to the Transforming Growth Family factor type  $\beta$  ( $TGF\beta$ ). In most of the mutations found in the coding regions of these genes, heterozygous sheep show an increase in ovulatory rate and prolificacy; on the contrary, homozygous sheep are infertile. However, some breeds of sheep with a double mutation or homozygous copies have high ovulatory rates and prolificacy. These genetic variants found in the fecundity genes related to the ovulation rate and prolificacy in the sheep, represent a great utility in the implementation of genetic improvement programs, aimed at improving the reproductive efficiency and profitability of the flocks.

Keywords: Genes, *GDF9*, *BMP15*, *BMPR1B*, fecundity.

### 1.3 INTRODUCCIÓN

La reproducción en los ovinos juega un papel importante en la eficiencia y rentabilidad del rebaño. Esta eficiencia se podría medir a través de la fertilidad y la prolificidad en la oveja (Abdoli *et al.*, 2016), especie que ha demostrado ser un modelo animal ideal para dilucidar el efecto de los factores genéticos que intervienen en la función reproductiva. La especie ovina presenta gran variabilidad genética, entre y dentro de razas, en variables reproductivas tales como tasa ovulatoria y tamaño de la camada (Dash *et al.*, 2017; Fabre *et al.*, 2006; Hanrahan *et al.*, 2004) y, se ha documentado que esta variabilidad está asociada a genes de efecto mayor que intervienen en la función ovárica (Hanrahan *et al.*, 2004) y modifican la tasa ovulatoria y tamaño de la camada o prolificidad. Dentro de estos genes de la fecundidad se encuentran: el Factor de Crecimiento y Diferenciación 9 (*GDF9*), la Proteína Morfogénica Ósea 15 (*BMP15*) y el receptor de Proteína Morfogénica Ósea tipo 1B (*BMPR-1B*), los cuales han sido identificados en diferentes razas de ovinos con gran prolificidad. Estos genes pertenecen a la familia del factor de crecimiento transformante tipo  $\beta$  (*TGF $\beta$* ) y son altamente expresados en el ovocito (De Castro *et al.*, 2016; Hanrahan *et al.*, 2004). Los *TGF $\beta$*  regulan el desarrollo y madurez folicular, interactúan con las células del ovocito-granulosa y regulan los receptores a gonadotropinas, entre otras funciones corporales vitales (Myers y Pangas, 2010; Knight y Glister, 2006; Hanrahan *et al.*, 2004). El conocimiento referente a la identificación e influencia de las variantes genéticas reportadas en estos genes de la fecundidad, permitirá comprender el control genético de polimorfismos y genotipos en variables reproductivas en la oveja. Por lo tanto, el objetivo

de esta revisión fue describir la función que desempeñan los genes *GDF9*, *BMP15* y *BMPR-IB* en la tasa ovulatoria y prolificidad de ovejas.

#### **1.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizó una búsqueda y se hizo un análisis exhaustivo de la información científica publicada en bases de datos de la Web of Science y Scopus, relacionada con los genes de la fecundidad en ovinos.

#### **1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En el análisis de la información de las bases de datos científicas, señalan que, el ovocito es la unidad funcional del ovario (Paulini y Melo, 2011) y para su desarrollo se requiere de una comunicación intrafolicular bidireccional con las células somáticas (Sanfins *et al.*, 2018). Se ha documentado que, durante la comunicación entre las células de la granulosa y el ovocito, se expresan factores de crecimiento (GF) y proteínas morfogénicas (BMP) que inducen el desarrollo folicular a través de un intrincado proceso de señalización parácrina (Sanfins *et al.*, 2018; Paulini y Melo, 2011). A continuación, se describen los aspectos más importantes de cada uno de ellos.

##### **1.5.1 Gen GDF9**

El gen *GDF9* ó *FecG* se encuentra en el cromosoma 5 de los ovinos (Sadighi *et al.*, 2002). Este gen tiene una longitud de 1365 pares de bases (pb) y está formado por dos exones y separados por un intrón. Este gen codifica un pre-propéptido de 456 aminoácidos y el péptido maduro activo es de 135 aminoácidos. (Bodensteiner *et al.*, 1999). El gen *GDF9* es altamente expresado en los ovocitos (Elvin *et al.*, 1999) y la proteína que codifica este

gen es miembro de la familia de las proteínas morfogénicas que pertenecen a la familia del Factor de Crecimiento Transformante tipo  $\beta$  (TGF $\beta$ , Abdoli *et al.*, 2016). Las principales funciones del gen *GDF9* en el ovario son: intervenir en la proliferación y organización de las células de la teca que rodean al folículo (Strauss y Williams, 2019), es esencial para la función ovárica normal, participa activamente en el crecimiento y desarrollo folicular en todas las etapas de la foliculogénesis, promueve la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa (Kona *et al.*, 2016; Juengel *et al.*, 2013; McGrath *et al.*, 1995), que requieren de la señalización parácrina del gen *GDF9* para que las enzimas hialuronano sintasa 2 y el activador del plasminógeno uroquinasa se expresen en el complejo ovocito-*cumulus* y se lleve a cabo la expansión del *cumulus*, el cual va a propiciar un micro ambiente favorable al ovocito; este proceso ocurre en los folículos preovulatorios antes de que se lleve a cabo la ovulación (Myers y Pangas, 2010; Dragovic *et al.*, 2005; Elvin *et al.*, 1999).

Cuando *GDF9* se une a su receptor de membrana tipo 2 o *BMPRII* (receptor de la proteína morfogénica ósea tipo II) en la célula de la granulosa (Figura 1), se activa el receptor tipo I o *ALK5* (receptor activina quinasa tipo 5); para que reconozcan y fosforile las proteínas SMAD [(por sus siglas en inglés Mothers Against Decantaplegic), el nombre SMAD se deriva de dos proteínas; una identificada en *Drosophila melanogaster*, MAD, y la segunda identificada en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (por sus siglas en inglés SMA o small body size que corresponde a la capacidad de ciertos genes modificados que alteran el tamaño corporal)] y, con ello se activan las vías de señalización SMAD 2 y 3; las cuales se unen a SMAD4 para formar un complejo heterotrimérico y trasladarse desde el citoplasma al núcleo y, una vez dentro, interactuar



con los reguladores transcripcionales para que se realice la transcripción de genes de respuesta y las funciones biológicas de diferenciación, estimulación del crecimiento del folículo preantral y la formación del fenotipo único (cuboidal) en células de la granulosa que rodean al ovocito (Sanfins *et al.*, 2018). Yamamoto *et al.* (2002) manifestaron que, *GDF9* inhibió la esteroidogénesis en las células de la granulosa y teca, mediante el bloqueo de la expresión de las enzimas P450<sub>scc</sub> y P450<sub>arom</sub>. Además, la interacción del kit ligando (KL; también llamado factor de células madre o factor de crecimiento de mastocitos) con su receptor c-kit en el ovocito (Figura 1), permite que *GDF9* potencialice el efecto del Factor de Crecimiento de Fibroblastos ocho (*FGF8*) en la producción de estradiol, sin afectar la producción de progesterona inducida por la hormona folículo estimulante (FSH) en las células de la granulosa (Miyoshi *et al.*, 2012). Así mismo, el gen *GDF9* inhibe la expresión del KL en células de la granulosa (Mazerbourg y Hsueh, 2006), suprime la apoptosis de estas células, a través de la activación de la vía de señalización PI3K/Akt (fosfatidilinositol- 3-quinasa/proteína quinasa) y la disminución de la atresia folicular, aumenta la supervivencia y crecimiento folicular durante la transición preantral a antral temprana. Además, este gen promueve la expresión del receptor GPCR (receptor acoplado a proteínas G, por sus siglas en inglés, clase A) de la FSH durante el desarrollo folicular (Orisaka *et al.*, 2006), ya que después de la etapa antral temprana, se requiere gran cantidad de receptores a FSH en las células de la granulosa para sostener el crecimiento constante del folículo antral que es dependiente de FSH (Otsuka *et al.*, 2011; Orisaka *et al.*, 2006).

En las razas Cambridge y Belclare, las ovejas heterocigotas incrementan su tasa ovulatoria; mientras que las ovejas homocigotas son infértiles, debido a la hipoplasia

ovárica y fallas primarias en la foliculogénesis (Hanrahan *et al.*, 2004; Juengel *et al.*, 2002). El fenotipo de infertilidad en estas dos razas, está directamente relacionado al cambio del aminoácido serina (polar sin carga) por fenilalanina (no polar), este cambio de polaridad afecta la unión de *GDF9* a los receptores BMP tipo I o *ALK5* (Otsuka *et al.*, 2011; Hanrahan *et al.*, 2004). Por otro lado, en ovejas heterocigotas de la raza Thoka, la sustitución del aminoácido serina (polar sin carga) por arginina (polar), aumentó la tasa ovulatoria, mientras que las homocigotas presentaron infertilidad, debido a un útero rudimentario, ovarios pequeños e inactivos y sin desarrollo folicular (Nicol *et al.*, 2009). Contrario a lo anteriormente indicado, en las razas Santa Inés, Blanca Noruega y Finnsheep, las ovejas homocigotas presentaron una alta tasa ovulatoria y prolificidad, lo cual indica que en estas tres razas con genotipo homocigoto son fértiles (Mullen y Hanrahan, 2014; Våge *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2010). A la fecha, se han reportado 11 mutaciones en la región codificante del gen *GDF9*, pero sólo cinco afectan la tasa ovulatoria y el tamaño de la camada (Cuadro 1); las mutaciones reportadas para este gen son: *G1*, *G2*, *G3*, *G4*, *G5*, *G6*, *G7*, *G8* o *FecG<sup>H</sup>* (alta fertilidad) (Hanrahan *et al.* 2004), *FecG<sup>T</sup>* (Thoka, Nicol *et al.* 2009), *FecG<sup>E</sup>* (Embrapa, Silva *et al.* 2010), *G7* o *FecG<sup>NWS</sup>* (Oveja Blanca Noruega, Våge *et al.*, 2013) y *FecG<sup>V</sup>* (Vecaria, Souza *et al.*, 2014).

### 1.5.2 Gen BMP15

El gen *BMP15* o *GDF-9B*, también llamado *FecX*, se localiza en el cromosoma X de los ovinos (Galloway *et al.*, 2000). Este gen tiene una longitud de 1179 pb y está formado por dos exones que están separados por un intrón. Este gen codifica un pre-propéptido de 393 aminoácidos y el péptido maduro activo es de 125 aminoácidos (Galloway *et al.*,

2000). El gen *BMP15* se expresa en los folículos hasta la etapa tipo 2 de desarrollo, células de cúmulus y en ovocitos; estructuralmente está relacionado con el gen *GDF9*, debido a su patrón de expresión similar (Strauss y Williams, 2019; Abdoli *et al.*, 2016; Galloway *et al.*, 2000). La proteína que codifica el gen *BMP15* es miembro de la familia de las proteínas morfogénicas óseas que pertenecen al factor de crecimiento transformante tipo  $\beta$  (Abdoli *et al.*, 2016; Hanrahan *et al.*, 2004). Las principales funciones del gen *BMP15* a nivel ovárico son estimular el crecimiento y diferenciación de las células de la granulosa; que mediante uniones homotípicas de la Conexina-37, favorecen el intercambio de nutrientes y señales con el ovocito (Strauss y Williams, 2019). Cuando *BMP15* se une a su receptor de membrana tipo 2 o *BMPRII* en las células de la granulosa (Figura 1), se activa el receptor tipo I o *ALK6* (receptor activina quinasa tipo 6) para que reconozca y fosforile a las proteínas SMAD y así, se activen las vías de señalización SMAD 1/5/8 (McNatty *et al.*, 2005; Moore y Shimasaki, 2005; Moore *et al.*, 2003), estas vías de señalización se unen a SMAD4 y forman un complejo oligomérico para que puedan ingresar al núcleo y, una vez dentro, se unen a cofactores específicos para que inicien la transcripción de los genes requeridos por la célula y estimulen la proliferación de las células de la granulosa, crecimiento y desarrollo del folículo preantral y se lleve a cabo la glucólisis en las células del *cumulus* y diferenciación celular; o también para desactivar dichas funciones (Sanfins *et al.*, 2018; Myers y Pangas 2010; Sugiura *et al.*, 2007). El gen *BMP15* también induce la expresión del KL en células de la granulosa para que se lleve a cabo la esteroidogénesis; pero por otro lado, el KL inhibe la expresión del gen *BMP15* en el ovocito (Miyoshi *et al.*, 2012; Mcnatty *et al.*, 2005). Así mismo, en presencia del ovocito, tanto el KL como el gen *BMP15*, estimulan la mitosis de las células de la

granulosa (Strauss y Williams, 2019) y reducen la producción de progesterona al suprimir la expresión de la enzima reguladora StAR (proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis) (Regan *et al.* 2018; De Castro *et al.*, 2016; Chang *et al.*, 2013).

Los homodímeros *GDF9:GDF9* y *BMP15:BMP15* poseen actividad biológica; sin embargo, los heterodímeros, *GDF9:BMP15* de las proteínas de estos genes, recientemente denominados cumulina, son más bioactivos y actúan como potentes reguladores de las funciones de las células de la granulosa y del *cumulus*, mejorando así la calidad del ovocito (Strauss y Williams, 2019; Sanfins *et al.*, 2018).

En la actualidad en distintas razas de ovinos a nivel mundial han reportado nueve mutaciones causales diferentes en la región codificante del gen *BMP15* (Cuadro 1). Las mutaciones son: Inverdale y Hanna (Galloway *et al.*, 2000), Belclare y Galway (Hanrahan *et al.*, 2004), Lacaune (Bodin *et al.*, 2007), Raza Aragonesa (Monteagudo *et al.*, 2009; Martínez-Royo *et al.*, 2008) y Barbarina Tunesina (Lassoued *et al.*, 2017). Estas ovejas con genotipo heterocigoto, presentan un incremento en su tasa ovulatoria y tamaño de la camada; mientras que las homocigotas son infértiles, debido a una hipoplasia ovárica, función anormal de las células del *cúmulus* y fallas primarias en la foliculogénesis (Strauss y Williams, 2019; Hanrahan *et al.*, 2004; Juengel *et al.*, 2002). No obstante, las ovejas homocigotas de las razas Grivette y Olkuzka, son fértiles y tienen una alta tasa ovulatoria y gran tamaño de la camada (Demars *et al.*, 2013).

### 1.5.3 Receptor del gen *BMPR-1B*

El receptor del gen *BMPR-1B*, gen Booroola (*FecB*) o receptor activina quinasa tipo 6 (ALK6) se localiza en el cromosoma 6 de los ovinos (Mulsant *et al.*, 2001; Souza *et al.*,

2001; Wilson *et al.*, 2001). Este es un gen autosómico dominante responsable de la alta fecundidad en ovejas Merino Booroola, con un efecto aditivo en tasa ovulatoria y parcialmente dominante en tamaño de la camada (Hua y Yang, 2009; Davis, 2005). Se ha documentado que este gen se expresa en el cerebro, cerebelo, hipotálamo, hipófisis, riñones, útero y oviducto (Tang *et al.*, 2018; Wilson *et al.*, 2001); sin embargo, su mayor expresión es en las células germinales primordiales del ovario, detectándose a los 35 y 55 días de gestación. Este hallazgo sugiere que la forma mutante de *BMPR-IB* interviene en el proceso de formación (Reader *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2004), desarrollo y madurez de los folículos a nivel ovárico (Tang *et al.*, 2018). La mutación responsable del fenotipo Booroola en las ovejas Merino fue la sustitución de adenina por guanina en la posición 746 y, en la posición 249 de la proteína, la glutamina cambió por arginina (Mulsant *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001). Esta mutación, que es altamente conservada, se cree que favorece la esteroidogénesis en las células de la granulosa, lo cual conduce a una diferenciación avanzada de estas células, que posiblemente comenzó desde el inicio de la formación folicular (Mulsant *et al.*, 2001). Así mismo, se ha reportado que la madurez precoz de los folículos, aunado al rápido inicio para responder a la acción de la hormona luteinizante (LH) a través de su receptor GPCR (receptor acoplado a proteínas G), permite que más folículos preovulatorios,  $\geq 1$  mm de diámetro, sobrevivan al efecto inhibitorio de esta hormona, cuando se realiza la selección del folículo ovulatorio, lo cual va a permitir contar con más folículos para ovular (Guo *et al.*, 2018; Juengel *et al.*, 2013; Crawford *et al.*, 2011).

Recientemente en un estudio proteómico realizado en ovejas Han de cola pequeña con la mutación *FecB* homocigota, reportaron que la alta prolificidad provocada por dicha

mutación en parte es debida al mayor nivel de expresión de las enzimas: nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa (NADH), ATPasa tipo F (enzima adenosíntrifosfato), fumarato reductasa y componentes del Citocromo C oxidasa; que conducen a una mayor actividad oxidativa en las mitocondrias del ovario. Dada la alta actividad oxidativa de carbohidratos y lípidos, para la obtención de energía para el ovocito, se producen grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno; sin embargo, en el fluido folicular de las ovejas con la mutación *FecB*, se han detectado grandes cantidades de antioxidantes de defensa como la cisteína (disulfuro glutatión-cisteína y aminoácido  $\gamma$ -glutamil) para contrarrestar los efectos nocivos de los radicales libres, donde se especula que los antioxidantes de defensa detectados en el fluido folicular de ovejas homocigotas a *FecB*, puede tener efectos benéficos en el desarrollo de más ovocitos. Además, en estas ovejas, encontraron altos niveles de aminoácidos, tales como treonina, aspartato, asparagina, lisina, cisteína y arginina, que junto con los antioxidantes de defensa encontrados en el fluido folicular, proporcionan un mejor microambiente nutricional que se ve reflejado en el crecimiento, madurez y calidad de los ovocitos (Guo *et al.*, 2018; Miao *et al.*, 2016). Por otra parte, en ovejas homocigotas *FecB* de la raza Han, presentaron un mayor nivel de expresión del estradiol 17 $\beta$ -deshidrogenasa, enzima involucrada en el metabolismo de estrógenos y andrógenos. La enzima estradiol 17 $\beta$ -deshidrogenasa desempeña un papel importante en la ovulación y su mayor nivel de expresión en ovejas homocigotas pudo contribuir a su alta tasa ovulatoria (Miao *et al.*, 2016).

En un estudio conducido por Abdurahman *et al.* (2019) reportaron que SMAD4 funciona como un factor de transcripción y mediante una retroacción positiva indujo la

transcripción de *BMPR-1B*; posteriormente reguló la apoptosis celular mediada por *BMPR-1B* en células de la granulosa ovina. Así mismo, estos autores reportaron que existe una regulación de la retroacción dentro de la vía de señalización BMP/Smad en las células de la granulosa.

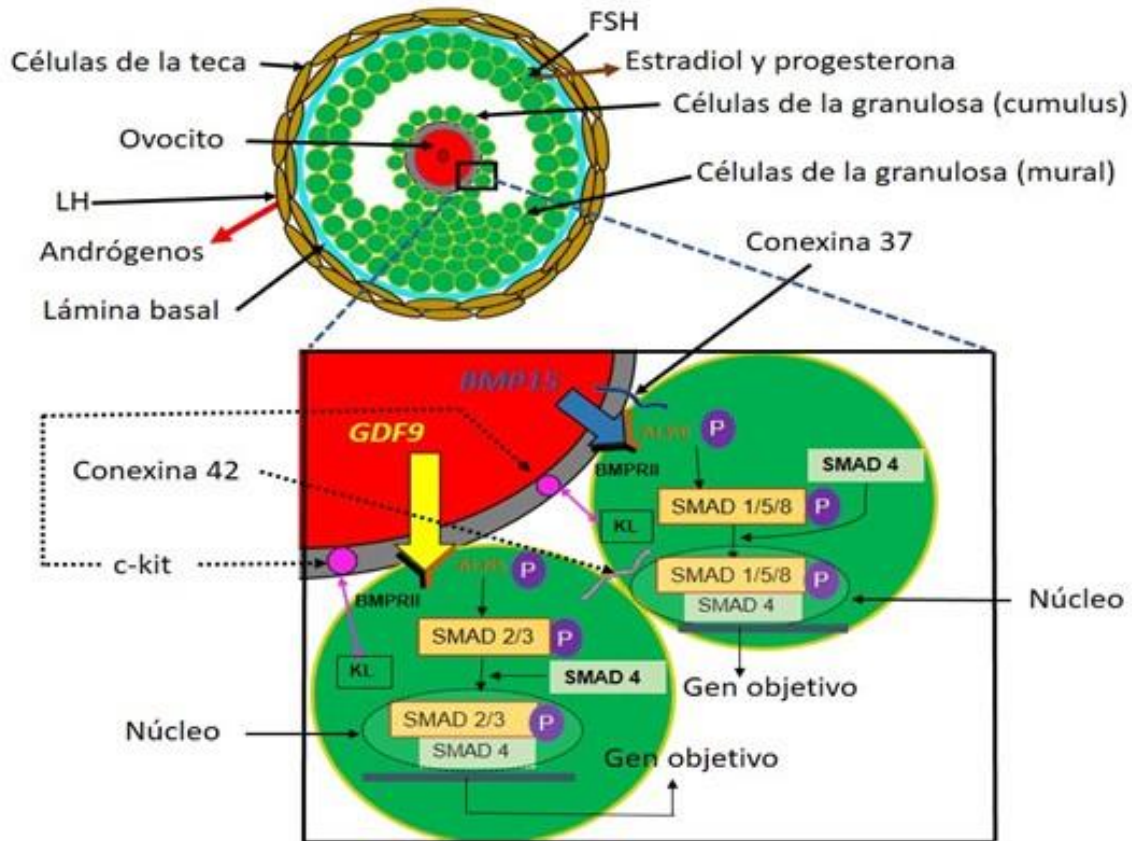


Figura 1. Representación esquemática de señalización parácrina entre el ovocito y las células de la granulosa. Imagen modificada de Gilchrist *et al.* (2008) y Myers y Pangas (2010).

Actualmente, se han reportado diferentes mutaciones en los tres genes de la fecundidad descritos anteriormente, en diferentes razas de ovejas prolíficas en el mundo. Estos genes pertenecen a la súper familia del factor de crecimiento transformante tipo  $\beta$  (Cuadro 1).

Cuadro 1. Polimorfismos o mutaciones puntuales en genes de la fecundidad *BMPR-1B*, *BMP15* y *GDF9* en razas de ovinos prolíficas a nivel mundial.

| Gen            | Alelo o SNP             | Raza                                      | Cambio en nucleótido   | Cambio en aminoácido | Tasa ovulatoria  | Prolificidad  | País   | Referencia  |
|----------------|-------------------------|---|------------------------|----------------------|--|---|--|---|
| <i>BMPR-1B</i> | <i>FecB<sup>B</sup></i> | Merino<br>Javanese<br>Han de cola pequeña | p.746 A→G              | Gln249Arg            | BB:4.6-7.1<br><br>BB: 5.2 - 7.1<br><br>BB: 3.7<br>BB: 2.7 -3.0 | BB:2.0 – 2.2<br><br>BB: 2.0 – 3.0<br><br>BB: 2.1 - 2.9<br>BB: 2.6 - 2.8 | Australia<br>Reino Unido<br>Nueva Zelanda<br><br>Indonesia,<br>China | Mulsant <i>et al.</i> (2001),<br>Souza <i>et al.</i> (2001)<br>Wilson <i>et al.</i> (2001),<br>Davis <i>et al.</i> (2006),<br>Chu <i>et al.</i> (2007), Chu<br><i>et al.</i> (2011) |
|                | -----                   | Mehraban                                  | p.112 C→A<br>p.113 C→G | Thr37Lys             | -  | M+: 1.3   | Irán   | Abdoli <i>et al.</i> (2013)   |
| <i>BMP15</i>   | <i>FecX<sup>I</sup></i> | Inverdale (Romney)                        | p.896 T→A              | Val299Asp            | I+ : 2.5-3.2   | I+: +0.6  | Nueva Zelanda  | Galloway <i>et al.</i> (2000)   |
|                | <i>FecX<sup>H</sup></i> | Hanna (Romney)                            | p.871 C→T              | Gln291Term           | H+: 2.6-3.2  | H+: +0.6  | Nueva Zelanda  | Galloway <i>et al.</i> (2000)   |
|                | <i>FecX<sup>B</sup></i> | Belclare (Belclare)                       | p.1100 G→T             | Ser367Ile            | B+: 3.3± 0.1   | B+: 2.4±0.6   | Irlanda e<br>Inglaterra  | Hanrahan <i>et al.</i> (2004)   |



|             |                           |                                |  |                     |                |                |                         |   |
|-------------|---------------------------|--------------------------------|--|---------------------|----------------|----------------|-------------------------|---|
|             | <i>FecX<sup>G</sup></i>   | Galway<br>(Belclare/Cambridge) | p.718 C→T                                  | Gln239Term          | G+: 2.7-3.1    | -              | Irlanda e<br>Inglaterra | Hanrahan <i>et al.</i> (2004)   |
|             | <i>FecX<sup>L</sup></i>   | Lacaune                        | p.962 G→A                                  | Cys321Tyr           | L+: 3.3-7.2    | L+: 1.75       | Francia                 | Bodin <i>et al.</i> (2007)  |
|             | <i>FecX<sup>R</sup></i>   | Roa (Aragonesa)                | p.525–541 del<br>(17 bp)                   | 208Term             | R+: 2.6        | R+: 1.7        | España                  | Martinez-Royo <i>et al.</i><br>(2008) y Monteagudo <i>et al.</i> (2009) |
|             | <i>FecX<sup>Gr</sup></i>  | Grivette                       | p.950 C→T                                  | Thr317Ile           | GrGr: 4.5      | GrGr: 2.5      | Francia                 | Demars <i>et al.</i> (2013)   |
|             | <i>FecX<sup>O</sup></i>   | Olkuska                        | p. 1009 A→C                                | Asn337His           | OO: 3.2        | OO: 3.0        | Polonia                 | Demars <i>et al.</i> (2013)   |
|             | <i>FecX<sup>Bar</sup></i> | Barbara Tunesina               | p. 301 G→ T;<br>302_304delCT<br>A; 310insC | Ala101Cys<br>Ter113 | +/Bar: 2.0±0.7 | +/Bar: 1.4±0.5 | Túnez                   | Lassoued <i>et al.</i> (2017)   |
| <i>GDF9</i> | <i>G1</i>                 | (Belclare/Cambridge)           | p. 260 G→A                                 | Arg87His            | -              | -              | Irlanda e<br>Inglaterra | Hanrahan <i>et al.</i> (2004)   |
|             | <i>G2</i>                 | (Belclare/Cambridge)           | p. 471 C→T                                 | Sin cambio<br>Val   | -              | -              | Irlanda e<br>Inglaterra | Hanrahan <i>et al.</i> (2004)   |
|             | <i>G3</i>                 | (Belclare/Cambridge)           | p.477 G→A                                  | Sin cambio<br>Leu   | -              | -              | Irlanda e<br>Inglaterra | Hanrahan <i>et al.</i> (2004)   |
|             | <i>G4</i>                 | (Belclare/Cambridge)           | p.721 G→A                                  | Glu241Lys           | -              | -              | Irlanda e<br>Inglaterra | Hanrahan <i>et al.</i> (2004)   |

|   |  |             |                |                        |  |                                    |  |
|---|--|-------------|----------------|------------------------|--|------------------------------------|--|
| G5  | (Belclare/Cambridge)                   | p.978 A→G   | Sin cambio Glu | -                      | -  | Irlanda e<br>Inglaterra            | Hanrahan <i>et al.</i> (2004)                            |
| G6  | (Belclare/Cambridge)                   | p.994 G→A   | Val332Ile      | -                      | -  | Irlanda e<br>Inglaterra            | Hanrahan <i>et al.</i> (2004)                            |
| G7  | (Belclare/Cambridge)                   | p.1111 G→A  | Val371Met      | -                      | -  | Irlanda e<br>Inglaterra            | Hanrahan <i>et al.</i> (2004)                            |
| <i>FecG<sup>H</sup></i>                                   | High fertility<br>(Belclare/Cambridge) | p. 1184 C→T | Ser395Phe      | H+: 4.3                | -  | Irlanda e<br>Inglaterra            | Hanrahan <i>et al.</i> (2004)                            |
| <i>FecG<sup>T</sup></i>                                   | Toka islandesa                         | p.1279 A→>C | Ser427Arg      | T+: + 1.2              | T+: +0.7                                     | Islandia                           | Nicol <i>et al.</i> (2009)                               |
| <i>FecG<sup>E</sup></i>                                   | Santa Inés                             | p.1034T→>G  | Phe345Cys      | EE: 2.2                | EE: 1.7                                      | Brasil                             | Silva <i>et al.</i> (2010)                               |
| <i>FecG<sup>V</sup></i>                                   | Vacaria (Ile de France)                | p. 943C→T   | Arg315Cys      | V+: 2.1                | V+: 1.6                                      | Brasil                             | Souza <i>et al.</i> (2014)                               |
| <i>FecG<sup>NWS</sup></i><br>o<br><i>FecG<sup>F</sup></i> | Oveja blanca Noruega,<br>Finnsheep     | p. 1111G→A  | Val371Met      | NWSNWS: 2.4<br>FF: 4.4 | NWSNWS: 2.3<br>FF: 0.46-0.57<br>más corderos | Noruega<br>Irlanda e<br>Inglaterra | Våge <i>et al.</i> (2013)<br>Mullen y Hanrahan<br>(2014) |

p. = posición en la secuencia nucleotídica, A= Adenina, G= Guanina, C= Citocina. T= Timina, Gln= Glutamina, Arg= Arginina, Thr=Treonina, Lys= Lisina, Val= Valina, Asp= Ácido aspártico, Ser= Serina, Ile= Isoleucina, Cys= Cisteína, Tyr= Tirosina, Asn= Asparagina, His= Histidina, Ala= Alanina, Leu= Leucina, Glu= Acido glutámico, Met= Metionina, Phe= Fenilalanina, BB= booroola homocigota, M+= Mehraban heterocigota, H+= Hanna heterocigota, I+= Inverdale heterocigota, B+= Belclare heterocigota, G+= Galway heterocigota, L+= Lacaune heterocigota, R+= rasa aragonesa heterocigota, GrGr= Grivette homocigota, OO= Olkuska homocigota, +/Bar= Bárbara tunecina heterocigota, H+: alta prolificidad heterocigota, T+= Toka heterocigota, EE= Embrapa homocigota, V+: Vecaria heterocigota NWSNWS= ovejas blanca noruega homocigota, FF= Finnsheep homocigota.

## 1.6 CONCLUSIONES

El gen *GDF9* promueve la proliferación, organización y diferenciación de las células de la teca y granulosa, es fundamental en la foliculogénesis, potencializa el efecto del *FGF8* en la producción de estradiol, inhibe la apoptosis de las células de la granulosa y disminuye la atresia folicular; además promueve la expresión del receptor a la FSH en las células de la granulosa durante el desarrollo folicular. El gen *BMP15* estimula la mitosis, proliferación, crecimiento y diferenciación de las células de la granulosa, promueve el crecimiento y desarrollo del folículo preantral, induce la expresión del KL en células de la granulosa, y reduce la producción de progesterona. El gen *BMPR-1B* favorece la esteroidogénesis en las células de la granulosa, interviene en la formación, desarrollo y madurez precoz de los folículos, esto permite que más folículos preovulatorios sobrevivan al efecto inhibitorio de la LH, cuando se realiza la selección del folículo ovulatorio. En la mayoría de los genes *GDF9* y *BMP15*, las ovejas heterocigotas aumentan su tasa ovulatoria y prolificidad en tanto que las homocigotas son infértiles. Sin embargo, algunas razas de ovinos con doble copia mutada u homocigotas tienen una alta tasa ovulatoria y prolificidad. Las variantes genéticas o mutaciones encontradas en estos genes de la fecundidad pueden ser utilizadas en la selección asistida por genes para implementar programas masivos de reproducción y de mejoramiento genético, con la finalidad de mejorar la eficiencia reproductiva y la rentabilidad del rebaño de forma natural.

## 1.7 LITERATURA CITADA

- Abdoli, R., Zamani, P., Deljou, A., & Rezvan, H. (2013). Association of BMPR-1B and GDF9 genes polymorphisms and secondary protein structure changes with reproduction traits in Mehraban ewes. *Gene*, 524(2), 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.133>
- Abdoli, R., Zamani, P., Mirhoseini, S. Z., Ghavi Hossein-Zadeh, N., & Nadri, S. (2016). A review on prolificacy genes in sheep. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 51(5), 631–637. <https://doi.org/10.1111/rda.12733>
- Abdurahman, A., Du, X., Yao, Y., Sulaiman, Y., Aniwashi, J., & Li, Q. (2019). Smad4 Feedback Enhances BMPR1B Transcription in Ovine Granulosa Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms20112732>
- Bodensteiner, K. J., Clay, C. M., Moeller, C. L., & Sawyer, H. R. (1999). Molecular Cloning of the Ovine Growth/Differentiation Factor-9 Gene and Expression of Growth/Differentiation Factor-9 in Ovine and Bovine Ovaries<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 60(2), 381–386. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.2.381>
- Bodin, L., Di Pasquale, E., Fabre, S., Bontoux, M., Monget, P., Persani, L., & Mulsant, P. (2007). A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. *Endocrinology*, 148(1), 393–400. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0764>
- Chang, H. M., Cheng, J. C., Klausen, C., & Leung, P. C. K. (2013). BMP15 suppresses progesterone production by down-regulating StAR via ALK3 in human granulosa cells. *Molecular Endocrinology*, 27(12), 2093–2104. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1233>
- Chu, M., Jia, L., Zhang, Y., Jin, M., Chen, H., Fang, L., ... Li, K. (2011). Polymorphisms of coding region of BMPR-1B gene and their relationship with litter size in sheep. *Molecular Biology Reports*, 38(6), 4071–4076. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0526-z>
- Chu, M. X., Liu, Z. H., Jiao, C. L., He, Y. Q., Fang, L., Ye, S. C., ... Wang, J. Y. (2007). Mutations in BMPR-1B and BMP-15 genes are associated with litter size in Small Tailed Han sheep (*Ovis aries*). *Journal of Animal Science*, 85(3), 598–603. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-324>
- Crawford, J. L., Heath, D. A., Reader, K. L., Quirke, L. D., Hudson, N. L., Juengel, J. L., & McNatty, K. P. (2011). Oocytes in sheep homozygous for a mutation in bone morphogenetic protein receptor 1B express lower mRNA levels of bone

morphogenetic protein 15 but not growth differentiation factor 9. *Reproduction*, 142, 53–61. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0485>

Dash, S., Maity, A., Bisoi, P. C., Palai, T. K., Polley, S., Mukherjee, A., & De, S. (2017). Coexistence of polymorphism in fecundity genes BMPR 1B and GDF9 of Indian Kendrapada sheep. *Exploratory Animal and Medical Research*, 7(1), 33–38. Retrieved from <http://www.animalmedicalresearch.org/> ...

Davis, G. H., Balakrishnan, L., Ross, I. K., Wilson, T., Galloway, S. M., Lumsden, B. M., ... Notter, D. R. (2006). Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecXI) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. *Animal Reproduction Science*, 92(1–2), 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.001>

Davis, G. H. (2005). Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*, 37 Suppl 1, S11–S23. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-37-S1-S11>

De Castro, F. C., Cruz, M. H. C., & Leal, C. L. V. (2016). Role of Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and their importance in mammalian female fertility - A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(8), 1065–1074. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0797>

Demars, J., Fabre, S., Sarry, J., Rossetti, R., Gilbert, H., Persani, L., ... Bodin, L. (2013). Genome-wide association studies identify two novel BMP15 mutations responsible for an atypical hyperprolificacy phenotype in sheep. *PLoS Genetics*, 9(4), e1003482. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003482>

Dragovic, R. A., Ritter, L. J., Schulz, S. J., Amato, F., Armstrong, D. T., & Gilchrist, R. B. (2005). Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology*, 146(6), 2798–2806. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0098>

Elvin, J. A., Clark, A. T., Wang, P., Wolfman, N. M., & Matzuk, M. M. (1999). Paracrine Actions Of Growth Differentiation Factor-9 in the Mammalian Ovary. *Molecular Endocrinology*, 13(6), 1035–1048. <https://doi.org/10.1210/mend.13.6.0310>

Fabre, S., Pierre, A., Mulsant, P., Bodin, L., Di Pasquale, E., Persani, L., ... Monniaux, D. (2006). Regulation of ovulation rate in mammals: Contribution of sheep genetic models. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-20>

Galloway, S. M., McNatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P. E., Juengel, J. L., Jokiranta, T. S., ... Ritvos, O. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, 25(3), 279–283. <https://doi.org/10.1038/77033>

Gilchrist, R. B., Lane, M., & Thompson, J. G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators

- of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*, 14(2), 159–177. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm040>
- Guo, X., Wang, X., Di, R., Liu, Q., Hu, W., He, X., ... Chu, M. (2018). Metabolic effects of FecB gene on follicular fluid and ovarian vein serum in sheep (*Ovis aries*). *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms19020539>
- Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R., & Galloway, S. M. (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 70(4), 900–909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023093>
- Hua, G.-H., & Yang, L.-G. (2009). A review of research progress of FecB gene in Chinese breeds of sheep. *Animal Reproduction Science*, 116, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.01.001>
- Juengel, J. L., Davis, G. H., & McNatty, K. P. (2013). Using sheep lines with mutations in single genes to better understand ovarian function. *Reproduction*, 146(4), 111–123. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0509>
- Juengel, J. L., Hudson, N. L., Heath, D. A., Smith, P., Reader, K. L., Lawrence, S. B., ... McNatty, K. P. (2002). Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep 1. *Biology of Reproduction*, 67(6), 1777–1789. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007146>
- Knight, P. G., & Glister, C. (2006). TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 132(2), 191–206. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01074>
- Kona, S. S. R., Praveen Chakravarthi, V., Siva Kumar, A. V. N., Srividya, D., Padmaja, K., & Rao, V. H. (2016). Quantitative expression patterns of GDF9 and BMP15 genes in sheep ovarian follicles grown in vivo or cultured in vitro. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.022>
- Lassoued, N., Benkhilil, Z., Woloszyn, F., Rejeb, A., Aouina, M., Rekik, M., ... Bedhiaf-Romdhani, S. (2017). FecXBar a novel BMP15 mutation responsible for prolificacy and female sterility in Tunisian Barbarine sheep. *BMC Genetics*, 18(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0510-x>
- Martinez-Royo, A., Jurado, J. J., Smulders, J. P., Martí, J. I., Alabart, J. L., Roche, A., ... Calvo, J. H. (2008). A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. *Animal Genetics*, 39(3), 294–297. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01707.x>
- Mazerbourg, S., & Hsueh, A. J. W. (2006). Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for growth differentiation factor 9 and related

- orphan bone morphogenetic protein / growth differentiation factor ligands. *Human Reproduction Update*, 12(4), 373–383. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml014>
- McGrath, A. S., Esquela, F. A., & Lee, J. S. (1995). Oocyte-Specific Expression of Growth / Differentiation. *Mol Ecular Endocrinology*, 9(1), 131–136. <https://doi.org/10.1210/mend.9.1.7760846>
- McNatty, K. P., Juengel, J. L., Reader, K. L., Lun, S., Myllymaa, S., Lawrence, S. B., ... Laitinen, M. P. E. (2005). Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. *Reproduction*, 129(4), 481–487. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00517>
- Miao, X., Luo, Q., Zhao, H., & Qin, X. (2016). Ovarian proteomic study reveals the possible molecular mechanism for hyperprolificacy of Small Tail Han sheep. *Scientific Reports*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep27606>
- Miyoshi, T., Otsuka, F., Nakamura, E., Inagaki, K., Ogura-ochi, K., Tsukamoto, N., ... Makino, H. (2012). Regulatory role of kit ligand-c-kit interaction and oocyte factors in steroidogenesis by rat granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 358(1), 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.02.011>
- Monteagudo, V. L., Ponz, R., Tejedor, M. T., Laviña, A., & Sierra, I. (2009). A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 ( BMP15 ) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. *Animal Reproduction Science*, 110(1), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.005>
- Moore, R. K., Otsuka, F., & Shimasaki, S. (2003). Molecular Basis of Bone Morphogenetic Protein-15 Signaling in Granulosa Cells\*. *The Jorunal of Biological Chemistry*, 278(1), 304–310. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207362200>
- Moore, R. K., & Shimasaki, S. (2005). Molecular biology and physiological role of the oocyte factor , BMP-15. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 234(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.10.012>
- Mullen, M. P., & Hanrahan, J. P. (2014). Direct evidence on the contribution of a missense mutation in GDF9 to variation in ovulation rate of Finnsheep. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095251>
- Mulsant, P., Lecerf, F., Fabre, S., Schibler, L., Monget, P., Lanneluc, I., ... Elsen, J.-M. (2001). Mutation in bone morphogenetic protein receptor-1B is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérino ewes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(9), 5104–5109. <https://doi.org/10.1073/pnas.091577598>
- Myers, M., & Pangas, S. A. (2010). Regulatory roles of transforming growth factor beta family members in folliculogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2(1), 117–125. <https://doi.org/10.1002/wsbm.21>

- Nicol, L., Bishop, C. S., Pong-Wong, R., Bendixen, C., Holm, L.-E., Rhind, M. S., & Mcneilly, S. A. (2009). specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *Reproduction*, 138(6), 921–933. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0193>
- Orisaka, M., Orisaka, S., Jiang, J.-Y., Craig, J., Wang, Y., Kotsuji, F., & Tsang, B. K. (2006). Growth Differentiation Factor 9 Is Antiapoptotic during Follicular Development from Preantral to Early Antral Stage. *Molecular Endocrinology*, 20(10), 2456–2468. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0357>
- Otsuka, F., McTavish, K. J., & Shimasaki, S. (2011). Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Molecular Reproduction and Development*. <https://doi.org/10.1002/mrd.21265>
- Paulini, F., & Melo, E. O. (2011). The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(2), 354–361. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01739.x>
- Reader, K. L., Haydon, L. J., Littlejohn, R. P., Juengel, J. L., & McNatty, K. P. (2012). Booroola BMPR1B mutation alters early follicular development and oocyte ultrastructure in sheep. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(2), 353–361. <https://doi.org/10.1071 / RD11095>
- Regan, S. L. P., Knight, P. G., Yovich, J. L., Leung, Y., Arfuso, F., & Dharmarajan, A. (2018). Involvement of bone morphogenetic proteins ( BMP ) in the regulation of ovarian function. *Ovarian Cycle* (1st ed., Vol. 107). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.01.015>
- Sadighi, M., Bodensteiner, K. J., Beattie, A. E., & Galloway, S. M. (2002). Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Animal Genetics*, 33(3), 244–245. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2002.t01-11-00876.x>
- Sanfins, A., Rodrigues, P., & Albertini, F. D. (2018). GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(10), 1741–1750. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1268-4>
- Silva, B. D. M., Castro, E. A., Souza, C. J. H., Paiva, S. R., Sartori, R., Franco, M. M., ... Melo, E. O. (2010). A new polymorphism in the growth and differentiation factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Animal Genetics*, 42, 89–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02078.x>
- Souza, C. J. H., González-Bulnes, A., Campbell, B. K., Mcneilly, A. S., & Baird, D. T. (2004). Mechanisms of action of the principal prolific genes and their application to sheep production. *Reproduction, Fertility and Development*, 16, 395–401. <https://doi.org/10.1071/RD04038>



- Souza, C. J. H., MacDougall, C., Campbell, B. K., McNeilly, A. S., & Baird, D. T. (2001). The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. *Journal of Endocrinology*, 169(2), R1–R6. <https://doi.org/10.1677/joe.0.169R001>
- Souza, C. J. H., McNeilly, A. S., Benavides, M. V., Melo, E. O., & Moraes, J. C. F. (2014). Mutation in the protease cleavage site of GDF9 increases ovulation rate and litter size in heterozygous ewes and causes infertility in homozygous ewes. *Animal Genetics*, 45(5), 732–739. <https://doi.org/10.1111/age.12190>
- Strauss, J. F., & Williams, C. J. (2019). Ovarian Life Cycle. In J. S. R. B. A. Gargiulo (Ed.), *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management: Eighth Edition (Eighth Edi, pp. 167-205.e9)*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00008-1>
- Sugiura, K., Su, Y.-Q., Diaz, F. J., Pangas, S. A., Sharma, S., Wigglesworth, K., ... Eppig, J. J. (2007). Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development*, 134(4), 2593–2603. <https://doi.org/10.1242/dev.020024>
- Tang, J., Hu, W., Di, R., Liu, Q., Wang, X., Zhang, X., ... Chu, M. (2018). Expression analysis of the prolific candidate genes, BMPR1B, BMP15, and GDF9 in Small Tail Han ewes with three fecundity (FecB gene) genotypes. *Animals*, 8(166), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ani8100166>
- Våge, I. D., Husdal, M., Kent, P. M., Klemetsdal, G., & Boman, A. I. (2013). A missense mutation in growth differentiation factor 9 ( GDF9 ) is strongly associated with litter size in sheep. *BMC Genetics*, 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-1>
- Wilson, T., Wu, X., Juengel, L. J., Ross, K. I., Lumsden, M. J., Lord, A. E., ... Montgomery, W. G. (2001). Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein 1B receptor ( ALK-6 ) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 64(4), 1225–1235. <https://doi.org/10.1095 / biolreprod64.4.1225>
- Yamamoto, N., Christenson, L. K., McAllister, J. M., & Strauss III, J. F. (2002). Growth differentiation factor-9 inhibits 3'5'-adenosine monophosphate- stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(6), 2849–2856. <https://doi.org/10.1210 / jcem.87.6.8551>

## CAPÍTULO 2. ANÁLISIS DE LOS GENES *BMP15* Y *GDF9* Y SU RELACIÓN CON EL TIPO DE PARTO EN OVEJAS PELIBUEY

Canuto Muñoz García, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2020

### 2.1 RESUMEN

Con la finalidad de investigar los efectos de los genes de la fecundidad, proteína morfogénica ósea 15 (*BMP15*) y el factor de crecimiento y diferenciación 9 (*GDF9*), en la función ovárica y, debido a que la oveja Pelibuey es la raza de pelo de mayor distribución en México, pero tiene gran variabilidad en tasa ovulatoria y prolificidad; es necesario realizar estudios de estos genes relacionados con dichas variables reproductivas. Así, los objetivos de esta investigación fueron amplificar los exones 1 y 2 del *BMP15* y exón 2 de *GDF9*, detectar polimorfismos de una sola base (SNP) y determinar si existe asociación entre dichos genes y sus SNP con el tipo de parto, finalmente, realizar el modelado por homología de las proteínas de *BMP15* y *GDF9* en ovejas Pelibuey. Las secuencias de *BMP15* y *GDF9* se obtuvieron de muestras sanguíneas recolectadas en tarjetas Whatman™ FTA™ de 94 ovejas Pelibuey multíparas con registros reproductivos. Se analizó la calidad de las secuencias, se realizó el análisis de polimorfismo y se modelaron las proteínas de *BMP15* y *GDF9*. El 70.2 % de las ovejas amplificaron *BMP15* y *GDF9*, los cuales presentaron una asociación significativa con el tipo de parto doble y triple ( $p \leq 0.05$ ). El análisis de polimorfismo a nivel de nucleótidos en los exones 1 y 2 de *BMP15* no fue diferente y, en el exón 2 de *GDF9* se identificaron los polimorfismos G2, G3, G4, G5, G6 y *FecGE*; de estos, G2, G3 y G5 son mutaciones sinónimas, mientras que G4, G6 y *FecGE* son mutaciones no sinónimas, de las cuales sus genotipos no

tuvieron relación con el tipo de parto. Finalmente, el modelado de las proteínas de *BMP15* y *GDF9* mostró gran similitud con algunas proteínas del factor de crecimiento transformante tipo  $\beta$  (TGF $\beta$ ).

**Palabras clave:** Polimorfismos, proteína, tipo de parto, frecuencias alélicas.

## 2.2 ABSTRACT

In order to investigate the effects of fertility genes, bone morphogenic protein 15 (BMP15) and growth and differentiation factor 9 (GDF9), on ovarian function and, because the Pelibuey sheep is the breed of hair of greater distribution in Mexico, but it has great variability in ovulation rate and prolificacy; It is necessary to conduct studies of these genes related to these reproductive variables. Thus, the objectives of this investigation were to amplify exons 1 and 2 of BMP15 and exon 2 of GDF9, detect single-base polymorphisms (SNPs) and determine if there is an association between these genes and their SNPs with the type of birth, finally, perform homology modeling of BMP15 and GDF9 proteins in Pelibuey sheep. The BMP15 and GDF9 sequences were obtained from blood samples collected on Whatman™ FTA™ cards of 94 multiparous Pelibuey sheep with reproductive records. Sequence quality was analyzed, polymorphism analysis was performed and BMP15 and GDF9 proteins were modeled. 70.2% of the sheep amplified BMP15 and GDF9, which presented a significant association with the type of double and triple birth ( $p \leq 0.05$ ). The analysis of nucleotide polymorphism in exons 1 and 2 of BMP15 was no different and, in exon 2 of GDF9, polymorphisms G2, G3, G4, G5, G6 and FecGE were identified; of these, G2, G3 and G5 are synonymous mutations, while G4, G6 and FecGE are non-synonymous mutations, of which their genotypes were not related to the

type of delivery. Finally, the modeling of BMP15 and GDF9 proteins showed great similarity with some proteins of the transforming growth factor type  $\beta$  (TGF $\beta$ ).

### 2.3 INTRODUCCIÓN

La especie ovina presenta gran variabilidad genética, a nivel inter- e intra- raza, en tasa ovulatoria y prolificidad (Hanrahan *et al.* 2004; Fabre *et al.* 2006) y esta variabilidad se ha asociado a ciertos genes de la fecundidad, llamados *Fec* (Fabre *et al.* 2006; Albarella *et al.* 2015), los cuales pertenecen a la familia del TGF $\beta$ ; tales como *BMP15* o *FecX*, localizada en el cromosoma X (Galloway *et al.* 2000), *GDF9* o *FecG* que se encuentra en el cromosoma 5 (Sadighi *et al.* 2002) y el receptor de proteína morfogénica ósea tipo 1B (*BMPR1B*) o *FecB*, localizado en el cromosoma 6 (Mulsant *et al.* 2001). Estos genes se expresan en el ovocito (Hanrahan *et al.* 2004; Strauss y Williams 2019) y mediante las vías de señalización SMAD 2/3 y 1/5/8, que actúan en el complejo de células del ovocito-granulosa para regular la expresión de los receptores a gonadotropinas en células de la granulosa y teca, incrementan la mitosis de las células de la granulosa, estimulan el crecimiento folicular y regulan el fenotipo y expansión de las células del cumulus, entre otras funciones (Hanrahan *et al.* 2004; Knight y Glister 2006).

En ciertas razas de ovinos se han identificado polimorfismos en dichos genes. Por ejemplo, en el gen *BMP15*, las variantes reportadas son: *FecX<sup>H</sup>* (Hanna) y *FecX<sup>I</sup>* (Inverdale, Galloway *et al.* 2000), *FecX<sup>G</sup>* (Galway) y *FecX<sup>B</sup>* (Belclare, Hanrahan *et al.* 2004), *FecX<sup>L</sup>* (Lacaune; Bodin *et al.* 2007), *FecX<sup>R</sup>* (Roa, Monteagudo *et al.* 2009), *FecX<sup>Gr</sup>* (Grivette) y *FecX<sup>O</sup>* (Olkuska, Demars *et al.* 2013) y *FecX<sup>Bar</sup>* (Bárbara tunecina, Lassoued *et al.* 2017). Por otra parte, las mutaciones reportadas para el gen *GDF9* son: *G1*, *G2*,

*G3*, *G4*, *G5*, *G6*, *G7*, *G8* o *FecG<sup>H</sup>* (alta fertilidad) (Hanrahan *et al.* 2004), *FecG<sup>T</sup>* (Thoka, Nicol *et al.* 2009), *FecG<sup>E</sup>* (Embrapa, Silva *et al.* 2010), *G7* o *FecG<sup>NWS</sup>* (Oveja Blanca Noruega, Våge *et al.* 2013) y *FecG<sup>V</sup>* (Vecaria, Souza *et al.* 2014). En la mayoría de estas mutaciones en ambos genes, las ovejas con genotipo heterocigoto tienen un incremento en tasa ovulatoria, mientras que las ovejas homocigotas (mutadas) son infértiles, debido a una hipoplasia ovárica y fallas en la foliculogénesis (Juengel *et al.* 2002; Hanrahan *et al.* 2004). No obstante, las ovejas que presentan genotipo homocigoto en los polimorfismos *FecX<sup>Gr</sup>*, *FecX<sup>O</sup>*, *FecG<sup>E</sup>* y *FecG<sup>NWS</sup>*, son fértiles y presentan una alta tasa ovulatoria.

En México, la oveja Pelibuey es la de mayor distribución de las razas de pelo, debido a su capacidad de adaptación, resistencia a parasitosis, buena habilidad materna y estacionalidad reproductiva reducida (Valencia *et al.* 2006; De la Isla-Herrera *et al.* 2010; Macías-Cruz *et al.* 2015); sin embargo, posee una tasa ovulatoria ( $1.3 \pm 0.16$  a  $1.8 \pm 0.14$ ) y prolificidad variable ( $1.2 \pm 0.05$  a  $1.5 \pm 0.06$ ) (Cansino-Arroyo *et al.* 2009; De la Isla-Herrera *et al.* 2010; Martínez-Rojero *et al.* 2011); por lo que es relevante estudiar las causas y el control genético de estas características, para apoyar al desarrollo de los rebaños. Así, los objetivos de esta investigación fueron: 1) amplificar los exones 1 y 2 del gen *BMP15* y el exón 2 del gen *GDF9*, detectar los SNP y determinar si existe alguna asociación de dichos genes y sus SNP con el tipo de parto, y 2) realizar el modelado por homología de las proteínas de los genes *BMP15* y *GDF9* en ovejas Pelibuey.

## 2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.4.1 Ubicación y ovejas

Se utilizaron 94 ovejas Pelibuey, multíparas, con registros individuales de un mínimo de tres partos consecutivos; de estas, 36 fueron de parto sencillo, 41 de parto doble y 17 de parto triple, de la Unidad de Producción Agropecuaria “El Gargaleote”, propiedad de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en el municipio de Tamuín, S.L.P., México (22°00'04" N, 98°39'05" O y altitud de 30 m). El clima de este lugar es Aw''o (e), descrito como cálido subhúmedo con lluvias en verano, temperatura media anual de 25.8 °C y precipitación media anual de 882.8 mm (García 2004). La edad promedio de las ovejas fue de  $5.2 \pm 0.7$  años, con un peso vivo promedio de  $43.3 \pm 2.7$  kg. La alimentación de las ovejas fue a base de pasto Cayman® (13.5% de proteína, *Brachiaria* Híbrido cv. CIAT BR02/1752), más 0.3 kg de alimento balanceado (Borrega Plus®, 14% de proteína y 2.4 Mcal de energía metabolizable  $\text{kg}^{-1}$ , Productores Agropecuarios Tepexpan, S. A. de C.V. México), con acceso al agua limpia y fresca.

### 2.4.2 Recolección y conservación de muestras

Se recolectaron tres mL de sangre por punción de la vena yugular con jeringas estériles, bajo los criterios de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) (SAGARPA 2001) sobre especificaciones técnicas, para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, en concordancia con las regulaciones para el uso y cuidado de animales de investigación, aprobado por el Consejo General Académico del Colegio de Postgraduados, México (Colpos 2016). De la sangre recolectada, se colocaron 0.5 mL en una mini tarjeta Whatman™ FTA™ (WB 120055, GE Healthcare®, Reino Unido). Dichas

tarjetas se secaron a la sombra, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (GE Healthcare®, Reino Unido), hasta su posterior procesamiento. Esta fase se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de uso común del Posgrado de Fitosanidad, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, Texcoco, Estado de México.

#### 2.4.3 Procesamiento de muestras

Para la extracción de DNA, se realizaron cortes de aproximadamente un mm<sup>2</sup> de la mini tarjeta Whatman FTA impregnada con sangre y se depositó en un tubo Eppendorf de 0.2 mL. Posteriormente, se realizaron tres lavados con 200 µL del reactivo de purificación FTA (GE Healthcare®, Reino Unido) a temperatura ambiente, durante cinco minutos cada uno. A continuación, se realizaron dos lavados con 200 µL del buffer Tris (hidroximetil aminometano)-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) a temperatura ambiente, por cinco minutos.

#### 2.4.4 Amplificación de genes BMP15 y GDF9

Los genes se amplificaron mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La mezcla de reacción para la PCR se preparó en un volumen final de 12.5 µL, con 6.25 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2X (Promega® Madison, WI, E.U.A.), 0.625 µL de cada primer (*BMP15*, exón 1: For-5'-AATCCTTCTTTGGGGACTGG-3' y Rev-5'-AGCCCTAAAGGGAAGCAAAT-3', y exón 2: For-5'-CCAGAAAAGCCCAACCAATC-3' y Rev-5'-AGTGTAGTACCCGAGGACAT-3', AH009593.2, Galloway *et al.* 2000; *GDF9*; exón 2: For-5'-GGAGAAAAGGGACAGAAGC-3' y Rev-5'-ACGACAGGTACTTAGT-3', Silva *et al.* 2010; 10 µM; IDT®, Illinois, E.U.A.) y 5 µL de dihidrato de trehalosa al 10%

(Merck® KGaA 64271, Darmstadt, Alemania). Los tubos con el fragmento de la tarjeta procesada y la mezcla de reacción se colocaron en un termociclador Biometra®.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: *BMP15*, exón 1: desnaturalización inicial, 95 °C, cinco min, más 35 ciclos (desnaturalización, 95 °C, 30 s; alineamiento, 54 °C, 40 s y extensión, 72 °C, 30 s) y extensión final, 72 °C, cinco min; exón 2: desnaturalización inicial, 94 °C, cinco min, más 35 ciclos (desnaturalización, 94 °C, 30 s; alineamiento, 54.8 °C, 40 s y extensión, 72 °C, 30 s) y extensión final, 72 °C, cuatro min; *GDF9*, exón 2: desnaturalización inicial, 93 °C, tres min, más 35 ciclos (desnaturalización, 93 °C, 40 s; alineamiento, 56 °C, 40 s y extensión, 72 °C, 40 s) y extensión final, 72 °C, cinco min. Los amplicones obtenidos se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en un buffer de corrida Tris-Borato-EDTA al 1% (TBE; IBI Scientific, Dubuque, Iowa, E.U.A.), a 80 voltios durante 40 min. Se utilizó un marcador molecular de 250 a 10000 pb (Promega®, Wisconsin, E.U.A.). El gel se tiñó con Gel Red® (Biotium, Hayward, California, E.U.A., un µL diluido en 99 µL de TBE 1X y se tomaron seis µL) que se añadió al gel de agarosa. Y en cada pozo se depositaron 2.5 µL del amplicon más tres µL de Green GoTaq® Flexi buffer (Promega®, Wisconsin, E.U.A.). El gel se visualizó en un fotodocumentador Quantum® con el programa Vision Capt®.

#### 2.4.5 Secuenciación de DNA

Los amplicones que se obtuvieron de los genes (10 µL), se enviaron a la empresa MACROGEN® (Seúl, Corea del Sur) para su limpieza y secuenciación con los mismos iniciadores de amplificación de cada gen.



#### 2.4.6 Análisis bioinformático de secuencias

La calidad de las secuencias se analizó con el programa Sequencher<sup>®</sup> versión 5.4.6 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, E.U.A. <http://www.genecodes.com>). De las secuencias de cada gen, se realizó una búsqueda en Nucleotide BLAST del NCBI y se seleccionaron aquellas que tenían mayor similitud con las de nuestro estudio; para el gen *BMP15* fueron AH009593.2 y KT238844.1, en tanto que para *GDF9* fueron AF078545.2 y HE866499.1. De las secuencias de cada exón junto con las secuencias similares, se realizó un alineamiento para determinar el grado de similitud y detectar polimorfismos, con el algoritmo MUSCLE<sup>®</sup> (Edgar 2004) en MEGA 7<sup>®</sup> (Kumar *et al.* 2016). El análisis de los polimorfismos se realizó mediante las estadísticas básicas de las secuencias en MEGA 7<sup>®</sup> (Kumar *et al.* 2016). La traducción de proteínas se realizó con el código genético universal con la herramienta ORFfinder del NCBI. Para la detección de polimorfismos a nivel de aminoácidos, se realizó un alineamiento en MUSCLE<sup>®</sup>, disponible en: <http://www.drive5.com/muscle> (Edgar 2004). Finalmente se realizó el modelado por homología de las proteínas de los genes, en el programa Phyre<sup>2</sup>, disponible en: (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). La evaluación de la calidad del modelado se realizó con ProQ2 (Ray *et al.* 2012) y por el diagrama de Ramachandran, el cual muestra las combinaciones de los ángulos Phi y Psi que son permitidos en las proteínas.

#### 2.4.7 Análisis estadístico

La presencia de los genes *BMP15* y *GDF9* y su relación con el tipo de parto se analizó mediante el procedimiento FREQ (SAS 2013). Las frecuencias genotípicas del gen *GDF9*

se analizaron mediante el paquete Hardy-Weinberg de R (Team 2013) y su frecuencia alélica se analizó mediante un intervalo de confianza para dos proporciones binomiales  $p \pm Z_{\frac{\alpha}{2}} \sqrt{pq/n}$ , donde  $\frac{\alpha}{2} = 0.05$ . Además, se usó la prueba de neutralidad Tajima's D (Tajima 1989), como indicador de cambios históricos de expansión poblacional. Asimismo, la relación entre tipo de parto y genotipo del gen *GDF9* se analizó mediante el procedimiento LOGISTIC (SAS 2013).

## 2.5 RESULTADOS

### 2.5.1 Presencia de los genes BMP15 y GDF9

De las 94 ovejas muestreadas, sólo 66 amplificaron los genes *BMP15* y *GDF9* (70.2 %); del primero 1034 pb del exón 2 (a) y del segundo 481 pb del exón 1 y 527 pb del exón 2 (b y c, respectivamente) (Figura 2). Cabe señalar que, las ovejas que tuvieron el gen *BMP15* también tuvieron el gen *GDF9*.

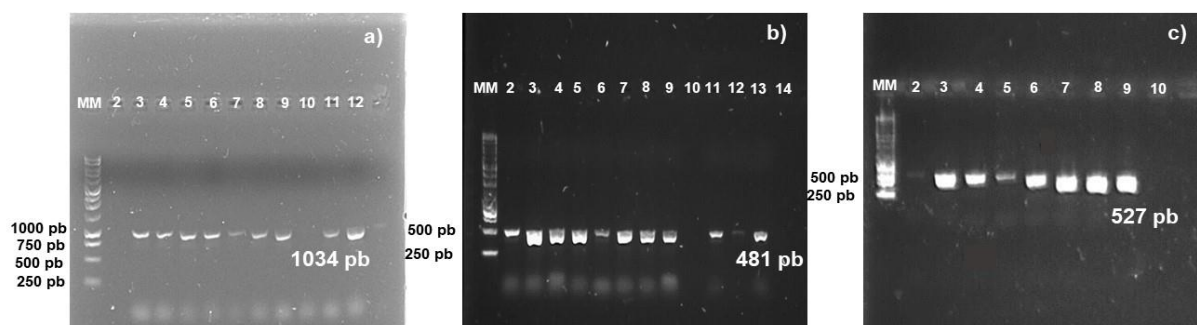


Figura 2. Amplificación del exón 2 (a) del gen *GDF9*, exón 1 (b) y exón 2 (c) del gen *BMP15* en ovejas Pelibuey; a) carril 1: MM= marcador molecular, 2: testigo negativo y carriles 3-12 muestras; b) carril 1: MM, carriles 2-13 muestras y carril 14: testigo negativo; c) carril 1: MM, carriles 2-9 muestras y carril 10: testigo negativo.

### 2.5.2 Los genes BMP15 y GDF9 y su relación con el tipo de parto

Las amplificaciones de los genes *BMP15* y *GDF9* se distribuyeron significativamente con los tipos de parto doble y triple ( $p < 0.05$ ), con respecto a las ovejas de parto sencillo; las de parto sencillo sólo amplificaron 11 de 36, de dobles 38 de 41 y de triples 17 de 17.

### 2.5.3 Análisis de secuencias de los genes *BMP15* y *GDF9*

De los exones amplificados, sólo se obtuvieron 60 secuencias y de éstas, 10 correspondieron a ovejas de parto sencillo, 33 de parto doble y 17 de parto triple. Las secuencias de este estudio tuvieron un 99.32 - 99.77 (*BMP15*) y 99.67 - 99.45 % (*GDF9*) de similitud con las secuencias AH009593.2, KT238844.1 para *BMP15* y AF078545.2, HE866499.1 para *GDF9*, respectivamente; provenientes de Estados Unidos de Norteamérica, Noruega, Nueva Zelanda y Egipto.

### 2.5.4 Búsqueda de polimorfismos en los genes *BMP15* y *GDF9*

El alineamiento de las secuencias de los exones 1 y 2 del gen *BMP15* de las ovejas Pelibuey junto con las secuencias AH009593.2 y KT238844.1 no presentó polimorfismos. Mientras que el alineamiento de las secuencias del exón 2 del gen *GDF9* de las ovejas Pelibuey, junto con las secuencias AF078545.2 y HE866499.1, señalaron la presencia de seis polimorfismos (*G2*, *G3*, *G4*, *G5*, *G6* y *FecGE*) (Figura 2), los cuales fueron principalmente por transición entre purinas ( $A=G$ ) en las posiciones: *G3* (477  $G>A$ ), *G4* (721 $G>A$ ), *G5* (978  $A>G$ ) y *G6* (994  $G>A$ ), pirimidinas ( $C=T$ ) en *G2* (471  $C>T$ ) y una transversión (pirimidina por purina) en *FecGE* (1034  $T>G$ ).

Los polimorfismos *G2*, *G3* y *G5* son mutaciones sinónimas o silenciosas que se presentaron en la posición tres del codón y no cambiaron el aminoácido. Por el contrario, los polimorfismos *G4*, *G6* y *FecGE* son mutaciones no sinónimas que se presentaron en

la posición uno del codón y modificaron el aminoácido. En el polimorfismo *G4* se substituyó el ácido glutámico por lisina; en *G6*, la valina fue reemplazada por isoleucina y en *FecG<sup>E</sup>*, fenilalanina fue substituida por una cisteína (Figura 2).

| Secs.      | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | GE |
|------------|----|----|----|----|----|----|
| 652Gs      | .  | .  | E  | .  | V  | F  |
| 678Gs      | .  | .  | E  | .  | I  | F  |
| 683Gs      | .  | .  | E  | .  | I  | C  |
| 729Gs      | .  | .  | E  | .  | V  | C  |
| 818Gs      | .  | .  | E  | .  | I  | C  |
| 845Gs      | .  | .  | E  | .  | V  | C  |
| 632Gd      | .  | .  | E  | .  | I  | F  |
| 636Gd      | .  | .  | E  | .  | I  | F  |
| 643Gd      | .  | .  | E  | .  | I  | C  |
| 712Gd      | .  | .  | K  | .  | V  | C  |
| 808Gd      | .  | .  | K  | .  | V  | F  |
| 813Gd      | .  | .  | K  | .  | V  | F  |
| 629GT      | .  | .  | E  | .  | I  | F  |
| 639GT      | .  | .  | E  | .  | I  | F  |
| 797GT      | .  | .  | E  | .  | V  | C  |
| 750GT      | .  | .  | E  | .  | I  | F  |
| 796GT      | .  | .  | E  | .  | V  | C  |
| 835GT      | .  | .  | E  | .  | I  | C  |
| 817GT      | .  | .  | E  | .  | V  | C  |
| AF078545.2 | .  | .  | E  | .  | V  | F  |
| HE866499.1 | .  | .  | E  | .  | V  | F  |

Figura 3. Los polimorfismos *G2*, *G3* y *G5* (sin cambio) y *G4*, *G6* y *FecG<sup>E</sup>* (con cambio) en el exón 2 del gen *GDF9* en ovejas Pelibuey. Secs. = secuencias, Gs = parto simple, Gd= parto doble, GT = parto triple, *G4* = ácido glutámico por lisina (E→K), *G6* = valina por isoleucina (V→I) y *FecG<sup>E</sup>* (GE) = fenilalanina por cisteína (F→C).

### 2.5.5 Análisis de polimorfismos en el gen *GDF9*

El análisis de polimorfismos por tipo de parto en el gen *GDF9*, señaló que las ovejas de parto doble tuvieron mayor polimorfismo con seis sitios variables, en tanto que las de parto simple y triple sólo presentaron cuatro y la prueba de Tajima (D) resultó ser positiva y diferente de cero (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis de polimorfismos y prueba de neutralidad de Tajima (D) del exón 2 del gen *GDF9* y su relación con el tipo de parto en ovejas Pelibuey.

| Parto  | NS | LS  | SC  | SV | S | Ps       | $\Theta$ | $\Pi$    | D        |
|--------|----|-----|-----|----|---|----------|----------|----------|----------|
| Simple | 10 | 931 | 927 | 4  | 2 | 0.003077 | 0.001088 | 0.001368 | 0.830172 |
| Doble  | 33 | 931 | 925 | 6  | 2 | 0.00409  | 0.001008 | 0.001379 | 0.733305 |
| Triple | 17 | 931 | 927 | 4  | 3 | 0.004144 | 0.001226 | 0.001930 | 1.626693 |
| Total  | 60 | 931 | 925 | 6  | 2 | 0.004090 | 0.000877 | 0.001237 | 0.702216 |

NS= número de secuencias, LS= longitud de secuencia, SC= sitios conservados, SV= sitios variables, S= sitios segregantes, Ps=sitios segregantes entre el número total de sitios,  $\Theta$ = cuatro por el tamaño efectivo poblacional por la tasa de mutación,  $\pi$ = diversidad nucleotídica, y D= estadístico de Tajima.

#### 2.5.6 Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos G4, G6 y *FecGE* en el exón 2 del gen *GDF9* y su relación con el tipo de parto

Las frecuencias genotípicas observadas de los polimorfismos *G4*, *G6* y *FecGE*, se desvían en forma significativa de las frecuencias genotípicas esperadas ( $p \leq 0.05$ ).

Referente a la frecuencia alélica, en el polimorfismo *G4*, el alelo A mostró una mayor frecuencia ( $p < 0.05$ ), mientras que en *G6*, la frecuencia alélica fue similar entre los alelos G y A ( $p > 0.05$ ); y para *FecGE*, el alelo G tuvo la mayor frecuencia alélica ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 3). Por otro lado, la prueba de  $\chi^2$  no mostró una relación significativa ( $p > 0.05$ ) en la asociación de genotipo (AA, AG y GG) por tipo de parto (sencillo, doble y triple) para los polimorfismos, *G4* ( $p = 0.9978$ ), *G6* (0.2377) y *FecGE* (0.1937) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos *G4*, *G6* y *FecG<sup>E</sup>* del exón 2 del gen *GDF9* y su relación con el tipo de parto en ovejas Pelibuey.

| SNP                     | Genotipo | Observada |       |        |       | Esperada |       |        |       | X <sup>2</sup> | Valor de P | Alelos | Frecuencia alélica |
|-------------------------|----------|-----------|-------|--------|-------|----------|-------|--------|-------|----------------|------------|--------|--------------------|
|                         |          | Simple    | Doble | Triple | Total | Simple   | Doble | Triple | Total |                |            |        |                    |
| <i>G4</i>               | GG       | 0         | 3     | 0      | 3     | 0.8      | 1.5   | 0.8    | 3.1   | 60.0           | 9.4857e-15 | G      | 0.05               |
|                         | GA       | 0         | 0     | 0      | 0     | 0        | 0.0   | 0.0    | 0.0   |                |            | A      | 0.95               |
|                         | AA       | 10        | 30    | 17     | 57    | 11.0     | 28.1  | 18.0   | 57.1  |                |            |        |                    |
| <i>G6</i>               | GG       | 4         | 19    | 7      | 30    | 6.1      | 14.9  | 9.1    | 30.1  | 60.0           | 9.4857e-15 | G      | 0.5                |
|                         | GA       | 0         | 0     | 0      | 0     | 0        | 0.0   | 0.0    | 0.0   |                |            | A      | 0.5                |
|                         | AA       | 6         | 14    | 10     | 30    | 5.6      | 14.7  | 9.6    | 29.9  |                |            |        |                    |
| <i>FecG<sup>E</sup></i> | GG       | 7         | 16    | 11     | 34    | 6.6      | 16.8  | 10.6   | 34.0  | 40.8           | 1.6439e-10 | G      | 0.61               |
|                         | GA       | 1         | 2     | 2      | 5     | 0.8      | 2.4   | 1.8    | 5.0   |                |            | A      | 0.39               |
|                         | AA       | 2         | 15    | 4      | 21    | 4.3      | 10.4  | 6.3    | 21.0  |                |            |        |                    |

Si el valor de P < 0.05, entonces no es consistente con el equilibrio Hardy-Weinberg. G= alelo dominante o portador, A= alelo recesivo o no portador, GG= genotipo mutado, GA= heterocigoto y AA= silvestre.

### 2.5.7 Modelado de las proteínas de los genes BMP15 y GDF9

El modelado de la proteína para el gen *GDF9* mostró una confianza del 100 %, un alineamiento de 88 % con los modelos del banco de proteínas (PDB, por sus siglas en inglés): estructura cristalina de pro-TGF  $\beta$ -1(3rjr), estructura del precursor de pro-activina (5hly) y la estructura cristalina del precursor pro-miostatina humana del *GDF8* (5ntu) y una cobertura del 73 % (Figura 3). Para la proteína del gen *BMP15*, la confianza fue de 100 %, un alineamiento del 89.3 % con los modelos 3rjr, 5hly y 5ntu y una cobertura de 78 % (Figura 4). En la evaluación de calidad ProQ2, el alineamiento de confianza para los genes *BMP15* y *GDF9*, tuvo una calidad del modelado de regular a buena. Así mismo, el análisis Remachandran para ambos genes, mostró que en general los aminoácidos se encuentran en regiones favorables y permitidas.

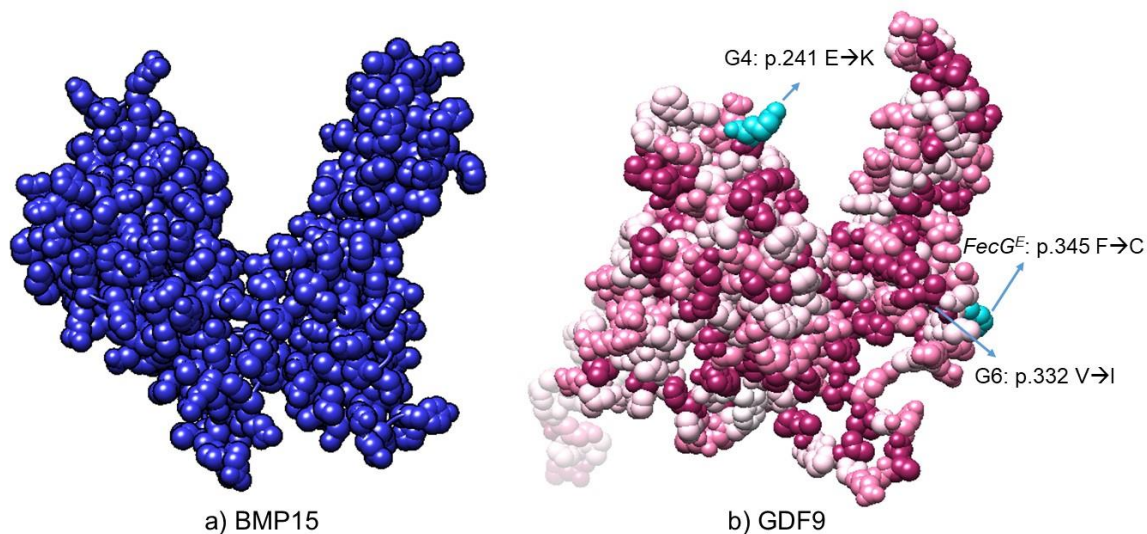


Figura 4. Modelado de las proteínas sin procesar de los genes *BMP15* (a) y *GDF9* (b) en ovejas Pelibuey.

En la proteína del gen *BMP15* no hubo cambio en aminoácidos. Por el contrario, en la proteína del gen *GDF9* se señalan los sitios en donde se lleva a cabo el cambio de

aminoácido; G4 = ácido glutámico por lisina (E→K), G6 = valina por isoleucina (V→I) y  $FecG^E$  = fenilalanina por cisteína (F→C).

## 2.6 DISCUSIÓN

En el 70.2 % (66 de 94) de las ovejas muestreadas amplificaron los exones 1 y 2 del gen *BMP15* y 2 del gen *GDF9*; sin embargo, el 29.8 % (28 de 94) no amplificaron y, de estas, 25 ovejas correspondieron a parto sencillo y tres a parto doble. Esto posiblemente es debido a que estos genes no estaban presentes en estas ovejas, o quizá estaban silenciados (Huntzinger e Izaurre, 2011). Es importante mencionar que el manejo de las muestras fue similar para todas las ovejas.

Las secuencias de ambos genes presentaron un porcentaje de similitud promedio del 99.5 % con las reportadas en el GenBank para *Ovis aries*; esto indica que las secuencias obtenidas en este estudio son homólogas a otros ovinos. En cuanto a la asociación de estos genes por tipo de parto, se observó diferencia significativa en ovejas de parto doble y triple ( $p < 0.05$ ), con respecto a las de parto sencillo. Esto se debe a que los dos genes intervienen en la función ovárica para una mayor tasa ovulatoria y prolificidad (Juengel *et al.* 2002; Hanrahan *et al.* 2004; McNatty *et al.* 2005).

En cuanto al nivel de polimorfismo en el gen *BMP15*, no hubo variación entre las secuencias de este estudio con las de referencia; lo cual indica que es un gen monomórfico; es decir, alguna variación en las regiones codificantes de este gen probablemente podrían afectar o destruir la función de la proteína (Weaver, 2012). Esto apoya que las mutaciones en el gen *BMP15* sean menores a las mutaciones en el gen *GDF9* (Hanrahan *et al.* 2004). Los resultados de este estudio coinciden con lo reportado



en ovejas Mehraban (Ahmadi *et al.* 2016); sin embargo, difieren con las mutaciones reportadas en ovejas Cambridge, Belclare y Pelibuey (Hanrahan *et al.* 2004; Argüello-Hernández *et al.* 2014).

En el análisis de polimorfismos por tipo de parto en el exón 2 del gen *GDF9*, las ovejas de parto doble tuvieron una mayor cantidad de polimorfismos, seguidas de las de parto triple y sencillo. Además, el estadístico de Tajima fue diferente de cero y positivo, lo cual señala que las mutaciones no son neutrales y que el rebaño está bajo un proceso de selección positiva, quizá para tener más crías por parto. Los polimorfismos *G2*, *G3* y *G5* son mutaciones sinónimas que no modificaron el aminoácido y no tienen un efecto en la prolificidad (Hanrahan *et al.* 2004; Escobar-Chaparro *et al.* 2017); además, no tienen efecto alguno en la función ovárica en ovejas Belclare, Cambridge y Bonpala (Hanrahan *et al.* 2004; Roy *et al.* 2011; Mullen *et al.* 2013), por lo que no se consideraron en este estudio. Sin embargo, los polimorfismos *G4*, *G6* y *FecGE* son mutaciones no sinónimas que modificaron el aminoácido.

Este cambio de aminoácidos dio como resultado cambios en su polaridad, *G4* cambió de un aminoácido con carga eléctrica negativa a uno con carga eléctrica positiva; así mismo, *FecGE* pasó de un aminoácido no polar a uno polar sin carga. Sin embargo, *G6* no presentó cambios en su polaridad. La sustitución de tres aminoácidos diferentes, así como el cambio en su polaridad, probablemente promovieron una mejor expresión del receptor BMP tipo I y una mejor unión a *GDF9*, lo cual propició que las ovejas Pelibuey homocigotas de este estudio fueran fértiles. Por su parte, Hanrahan *et al.* (2004) en ovejas Belclare y Cambridge; reportaron que la sustitución de serina por fenilalanina

(*GDF9*<sup>S77F</sup>), aminoácido polar sin carga cambió por uno no polar, al parecer afectó la unión de *GDF9* al receptor BMP tipo I, lo cual está directamente relacionado con la infertilidad en ovejas homocigotas (Hanrahan *et al.* 2004; Otsuka *et al.* 2011). Los cambios de aminoácido encontrados en este estudio coinciden con lo reportado en ovejas Belclare, Cambridge, Santa Inés e Ile de France (Hanrahan *et al.* 2004; Silva *et al.* 2010; Souza *et al.* 2014).

Cabe mencionar que no se encontraron los polimorfismos *G7* y *G8* en el exón 2 del gen *GDF9* reportados por Hanrahan *et al.* (2004), debido a que el tamaño del fragmento amplificado en este estudio fue menor al reportado por estos investigadores (1034 vs 1184 pb). Estos autores reportaron que las ovejas heterocigotas, con una copia mutada del polimorfismo *FecG<sup>H</sup>* (*G8*), aumentaron su tasa ovulatoria; mientras que las ovejas que llevaban dos copias mutadas a este polimorfismo fueron infértiles. Sin embargo, en este estudio se encontró que las ovejas homocigotas con doble copia mutada para el polimorfismo *FecG<sup>F</sup>* son fértiles, resultado similar al reportado en ovejas Santa Inés, (Silva *et al.* 2010), Blanca Noruega (Våge *et al.* 2013) y Pelibuey (Pérez-Ruiz *et al.* 2020). Finalmente, la gran cantidad de polimorfismos encontrados en el exón 2 del gen *GDF9* en ovejas Pelibuey, sugiere que este exón interviene de alguna manera en la foliculogénesis, proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y crecimiento del folículo preantral (McNatty *et al.* 2005; Fabre *et al.* 2006), lo que resultó en una mayor cantidad de ovocitos liberados para ser fertilizados e impactó de forma positiva en la fertilidad de estas ovejas Pelibuey homocigotas.

Para el caso de la frecuencia genotípica en las mutaciones no sinónimas, *G4*, *G6* y *FecGE*, los resultados de la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg mostraron que la población de ovejas Pelibuey de este estudio, está en desequilibrio en dichos polimorfismos, posiblemente debido a una heterosis reducida. Nuestros resultados son similares a los reportados por Albarella *et al.* (2015) en la oveja Bagnolese, pero diferentes a lo reportado por Escobar-Chaparro *et al.* (2017) en Katahdin, Dorper y Black Belly. Esta baja heterosis reportada, la cual no fue posible medir, dado que no se realizaron las cruzas para su determinación; indica que la variación genética es baja, de acuerdo a las frecuencias alélicas reportadas en este estudio, lo cual pudo deberse a una selección positiva (Tajima 1989), o quizá también al tamaño reducido del rebaño y a una posible endogamia (Kumar *et al.* 2007). Estas posibles causas quizá fueron determinantes para que no se encontrara una relación significativa de genotipo (*GG*, *GA* y *AA*) por tipo de parto (sencillo, doble o triple).

En cuanto al modelado de las proteínas de los genes *BMP15* y *GDF9* de este estudio, a pesar de que en el PDB no hubo una estructura específica para las proteínas de estos genes, las proteínas modeladas mostraron gran similitud con las proteínas de los modelos 3rjr, 5hly y 5ntu; lo cual es evidente, ya que los genes que codifican estas proteínas pertenecen a la familia del TGF $\beta$  (Knight y Glister 2006). En la proteína del gen *BMP15* no se presentaron cambios de aminoácido; sin embargo, en la proteína del gen *GDF9* hubo tres cambios de aminoácidos en posiciones diferentes.

## 2.7 CONCLUSIONES

Los genes *BMP15* y *GDF9* se encontraron en un 70.2% de la población ovina estudiada. La presencia de estos genes se distribuyó significativamente con el tipo de parto doble y triple, pero no con el sencillo. No se encontraron polimorfismos en los exones 1 y 2 del gen *BMP15*; sin embargo, en el exón 2 del gen *GDF9* se encontraron los polimorfismos *G2*, *G3*, *G4*, *G5*, *G6* y *FecG<sup>E</sup>*. Los polimorfismos *G4*, *G6* y *FecG<sup>E</sup>* modificaron de aminoácido, pero no así *G2*, *G3* y *G5*. Además, no se encontró relación de los genotipos GG, GA y AA de los polimorfismos *G4*, *G6* y *FecG<sup>E</sup>* con ningún tipo de parto. Las ovejas homocigotas a la mutación *FecG<sup>E</sup>* son fértiles. Las proteínas modeladas mostraron gran similitud con las proteínas del TGF $\beta$ . Sin embargo, se sugiere un estudio adicional para tener un modelo más preciso y determinar si cambia la estructura y función de la proteína de cada gen.

## 2.8 LITERATURA CITADA

- Ahmadi, F. Afraz, R. Talebi, A. F. and S. M. F. V. (2016). Investigation of GDF9 and BMP15 Polymorphisms in Mehraban Sheep to Find the Missenses as Impact on Protein. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 6(4), 863–872. Retrieved from [http://ijas.iaurasht.ac.ir/article\\_526632.html](http://ijas.iaurasht.ac.ir/article_526632.html)
- Albarella, S., Ciotola, F., Selvaggi, M., Dario, C., Licciardi, S., Scopino, G., ... Peretti, V. (2015). Analysis of major fecundity genes in autochthonous Laticauda and Bagnolese sheep breeds. *Small Ruminant Research*, 133(1), 118–122. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.09.005>
- Argüello-Hernández, H. J., Cortez-Romero, C., Rojas-Martínez, R. I., Segura-León, O. L., Herrera-Haro, J. G., Salazar-Ortiz, J., & Gallegos-Sanchez, J. (2014). Polimorfismos de la proteína 15 morfogénica ósea (*BMP15*) y su relación con el tipo de parto en la oveja Pelibuey. *Agrociencia*, 48(1), 53–69. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952014000100004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952014000100004)
- Bodin, L., Di Pasquale, E., Fabre, S., Bontoux, M., Monget, P., Persani, L., & Mulsant, P.

- (2007). A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. *Endocrinology*, 148(1), 393–400. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0764>
- Cansino-Arroyo, G., Herrera-Camacho, J., & Aké-López, J. (2009). Tasas de concepción, fertilidad y prolificidad en ovejas de pelo alimentadas con dietas enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*, 25(1), 181–185. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0186-29792009000200008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792009000200008&lng=es&tlng=es)
- Colpos. (2016). Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la investigación en el Colegio de Postgraduados. In *Reglamento para el uso y cuidado de animales en experimentación* (pp. 1–16).
- De la Isla-Herrera, G., Aké-López, J. R., Ayala-Burgos, A., & González-Bulnes, A. (2010). Efecto de la condición corporal y la época del año sobre el ciclo estral, estro, desarrollo folicular y tasa ovulatoria en ovejas Pelibuey mantenidas en condiciones de trópico. *Veterinaria México*, 41(3), 167–175. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-50922010000300001&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922010000300001&lng=es&tlng=es)
- Demars, J., Fabre, S., Sarry, J., Rossetti, R., Gilbert, H., Persani, L., ... Bodin, L. (2013). Genome-wide association studies identify two novel BMP15 mutations responsible for an atypical hyperprolificacy phenotype in sheep. *PLoS Genetics*, 9(4), e1003482. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003482>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Escobar-Chaparro, R. A., Guillén, G., Espejo-Galicia, L. U., Meza-Villalvazo, V. M., Peña-Castro, J. M., & Abad-Zavaleta, J. (2017). qPCR and HRM-based diagnosis of SNPs on growth differentiation factor 9 (GDF9), a gene associated with sheep (*Ovis aries*) prolificacy. *3 Biotech*, 7(3). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0837-z>
- Fabre, S., Pierre, A., Mulsant, P., Bodin, L., Di Pasquale, E., Persani, L., ... Monniaux, D. (2006). Regulation of ovulation rate in mammals: Contribution of sheep genetic models. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-20>
- Galloway, S. M., McNatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P. E., Juengel, J. L., Jokiranta, T. S., ... Ritvos, O. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, 25(3), 279–283. <https://doi.org/10.1038 / 77033>

- García, E. (2004). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. (I. de Geografía-UNAM, Ed.) (Quinta edi). México. Retrieved from [http://www.igeograf.unam.mx/sigg/utilidades/docs/pdfs/publicaciones/geo\\_siglo21/serie\\_lib/modific\\_al\\_sis.pdf](http://www.igeograf.unam.mx/sigg/utilidades/docs/pdfs/publicaciones/geo_siglo21/serie_lib/modific_al_sis.pdf)
- Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R., & Galloway, S. M. (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, *70*(4), 900–909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023093>
- Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, *12*, 99–110. <https://doi.org/10.1038/nrg2936>
- Juengel, J. L., Hudson, N. L., Heath, D. A., Smith, P., Reader, K. L., Lawrence, S. B., ... McNatty, K. P. (2002). Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep 1. *Biology of Reproduction*, *67*(6), 1777–1789. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007146>
- Knight, P. G., & Glister, C. (2006). TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, *132*(2), 191–206. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01074>
- Kumar, D., Sharma, R., Pandey, K. A., Gour, S. D., Malik, G., Ahlawat, S. P. S., & Jain, A. (2007). Genetic diversity and bottleneck analysis of Indian bellary sheep by microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics*, *43*(9), 996–1005. <https://doi.org/10.1134/s1022795407090050>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(1), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lassoued, N., Benkhilil, Z., Woloszyn, F., Rejeb, A., Aouina, M., Rekik, M., ... Bedhiaf-Romdhani, S. (2017). FecXBar a novel BMP15 mutation responsible for prolificacy and female sterility in Tunisian Barbarine sheep. *BMC Genetics*, *18*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0510-x>
- Macías-Cruz, U., Sánchez-Estrada, T. J., Gastelum-Delgado, M. A., Avendaño-Reyes, L., Correa-Calderón, A., Alvarez-Valenzuela, F., ... Mellado, M. (2015). Actividad reproductiva estacional de ovejas Pelibuey bajo condiciones áridas de México. *Archivos de Medicina Veterinaria*, *47*, 381–386.
- Martínez-Rojero, R. D., Santamaría-Reyna, L., Torres-Hernández, G., Mastache-Lagunas, A. A., & Michel-Aceves, A. C. (2011). Evaluación de la fertilidad y prolificidad en ciclos reproductivos de ocho meses durante tres estaciones en ovejas Pelibuey en el trópico seco mexicano. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, *21*(5), 383–387. Retrieved from

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95919362001>

- McNatty, K. P., Juengel, J. L., Reader, K. L., Lun, S., Myllymaa, S., Lawrence, S. B., ... Laitinen, M. P. E. (2005). Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. *Reproduction*, 129(4), 481–487. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00517>
- Monteagudo, V. L., Ponz, R., Tejedor, M. T., Laviña, A., & Sierra, I. (2009). A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 ( BMP15 ) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. *Animal Reproduction Science*, 110(1), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.005>
- Mullen, M. P., Hanrahan, J. P., Howard, D. J., & Powell, R. (2013). Investigation of prolific sheep from UK and Ireland for evidence on origin of the mutations in BMP15 (FecXG, FecXB) and GDF9 (FecGH) in Belclare and Cambridge sheep. *PLoS ONE*, 8(1), e53172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053172>
- Mulsant, P., Lecerf, F., Fabre, S., Schibler, L., Monget, P., Lanneluc, I., ... Elsen, J.-M. (2001). Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérino ewes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(9), 5104–5109. <https://doi.org/10.1073/pnas.091577598>
- Nicol, L., Bishop, C. S., Pong-Wong, R., Bendixen, C., Holm, L.-E., Rhind, M. S., & Mcneilly, S. A. (2009). specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *Reproduction*, 138(6), 921–933. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0193>
- Otsuka, F., McTavish, K. J., & Shimasaki, S. (2011). Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Molecular Reproduction and Development*. <https://doi.org/10.1002/mrd.21265>
- Pérez-Ruiz, E., Gallegos-Sánchez, J., Cortez-Romero, C., Segura-León, Obdulia L. Salinas-Ruíz, J., & Salazar-Ortiz, J. (2020). FecGE mutation in Pelibuey sheep. *Animal Genetics*, (January). <https://doi.org/10.1111/age.12912>
- Ray, A., Lindahl, E., & Wallner, B. (2012). Improved model quality assessment using ProQ2. *BMC Bioinformatics*, 13(224), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-224>
- Roy, J., Polley, S., De, S., Mukherjee, A., Batabyal, S., Pan, S., ... Goswami, S. L. (2011). Polymorphism of fecundity genes (FecB, FecX, and FecG) in the Indian Bonpala sheep. *Animal Biotechnology*, 22(3), 151–162. <https://doi.org/10.1080/10495398.2011.589239>
- Sadighi, M., Bodensteiner, K. J., Beattie, A. E., & Galloway, S. M. (2002). Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Animal Genetics*, 33(3), 244–245. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2002.t01-11->

00876.x

- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca, y Alimentación,). (2001). Norma oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de La Federación*, 22 Agosto, 107–165. Retrieved from [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999\\_220801.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf)
- SAS Institute Inc., Cary, NC, U. (2013). *SAS 9.4 Statements*®. (S. Institute, Ed.) (9.4 Statem). Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download;jsessionid=239E4F5E2E39CF2164C9BAD96900EA01?doi=10.1.1.353.6870&rep=rep1&type=pdf>
- Silva, B. D. M., Castro, E. A., Souza, C. J. H., Paiva, S. R., Sartori, R., Franco, M. M., ... Melo, E. O. (2010). A new polymorphism in the growth and differentiation factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Animal Genetics*, 42, 89–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02078.x>
- Souza, C. J. H., McNeilly, A. S., Benavides, M. V., Melo, E. O., & Moraes, J. C. F. (2014). Mutation in the protease cleavage site of GDF9 increases ovulation rate and litter size in heterozygous ewes and causes infertility in homozygous ewes. *Animal Genetics*, 45(5), 732–739. <https://doi.org/10.1111/age.12190>
- Strauss, J. F., & Williams, C. J. (2019). Ovarian Life Cycle. In J. S. R. B. A. Gargiulo (Ed.), *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management: Eighth Edition* (Eighth Edi, pp. 167-205.e9). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00008-1>
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1203831/pdf/ge1233585.pdf>
- Team, R. C. (2013). R: A language and environment for statistical computing. URL <Http://Www.R-Project.Org/>.
- Våge, I. D., Husdal, M., Kent, P. M., Klemetsdal, G., & Boman, A. I. (2013). A missense mutation in growth differentiation factor 9 ( GDF9 ) is strongly associated with litter size in sheep. *BMC Genetics*, 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-1>
- Valencia, J., Porras, A., Mejía, O., Berruecos, J. M., & Trujillo, J. (2006). Reproductive Activity of Pelibuey Ewe During the Anoestrus Season : *Revista Científica, FCV-LUZ*, XVI(2), 136–141.
- Weaver, R. F. (2012). *Molecular Bilology*. (University of Kansas, Ed.) (Fifth Edit). New York: McGraw-Hill.





## CAPÍTULO 3 GENOTIPOS DEL POLIMORFISMO *FecG<sup>F</sup>* Y SU INFLUENCIA EN LA RESPUESTA REPRODUCTIVA DE OVEJAS PELIBUEY EN LA ÉPOCA DE ANESTRO

Canuto Muñoz García, Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2020

### 3.1 RESUMEN

El factor de crecimiento y diferenciación 9 (*GDF9*) pertenece a la súper familia del factor de crecimiento transformante tipo  $\beta$  (*TGF $\beta$* ). Este gen interviene en la fertilidad y prolificidad de la oveja; variables importantes que intervienen en la eficiencia reproductiva de un rebaño. El objetivo de esta investigación fue evaluar la influencia de los genotipos del polimorfismo *FecG<sup>F</sup>* del gen *GDF9* en la respuesta natural de la manifestación a estro, retorno a estro, tasa ovulatoria, gestación, parición, prolificidad y fecundidad en ovejas Pelibuey, durante la época de anestro. Las secuencias del exón 2 del gen *GDF9* se obtuvieron de muestras sanguíneas recolectadas en tarjetas Whatman<sup>TM</sup> FTA<sup>TM</sup> de 42 ovejas Pelibuey multíparas con registros reproductivos. Para ello, la calidad de las secuencias se analizó y los polimorfismos y genotipos se buscaron. Las ovejas se agruparon de acuerdo a su genotipo: a) doble mutado o Embrapa (GG), b) silvestre (AA) y c) un grupo sin gen (sG). Todas las ovejas estudiadas manifestaron conducta estral, pero ninguna mostró signos de retorno al estro después de las montas naturales ( $p > 0.05$ ); así mismo, no se encontraron diferencias en el porcentaje de gestación y parición ( $p > 0.05$ ) entre grupos. No obstante, el genotipo GG presentó la tasa ovulatoria, prolificidad y fecundidad mayor ( $p < 0.05$ ), con respecto a los grupos AA y sG. Aunque no se encontraron diferencias en la manifestación de estro, retorno a estro, gestación y

parición en las hembras de los genotipos estudiados. Las ovejas del genotipo mutado GG presentaron 1.2 y 1.7 más cuerpos lúteos y 0.8 y 1.0 más corderos por oveja, que los producidos por el genotipo silvestre AA y grupo sG, respectivamente.

**Palabras clave:** Genotipo, *GDF9*, estro, gestación, tasa ovulatoria, prolificidad.

### 3.2 ABSTRACT

Growth factor and differentiation 9 (*GDF9*) belongs to the super family of transforming growth factor type  $\beta$  (*TGF $\beta$* ). This gene is involved in the fertility and prolificacy of the sheep; important variables involved in the reproductive efficiency of a herd. The objective of this research was to evaluate the influence of the *FecG<sup>E</sup>* polymorphism genotypes of the *GDF9* gene on the natural response of the manifestation to estrus, return to estrus, ovulatory rate, pregnancy, delivery, prolificity and fecundity in Pelibuey sheep, during the time of anoestrus. The exon 2 sequences of the *GDF9* gene were obtained from blood samples collected on Whatman™ FTA™ cards of 42 multiparous Pelibuey sheep with reproductive records. For this, the quality of the sequences was analyzed and the polymorphisms and genotypes were searched. The sheep were grouped according to their genotype: a) double mutated or Embrapa (GG), b) wild (AA) and c) a group without gene (sG). All sheep studied showed estrous behavior, but none showed signs of return to estrus after natural mounts ( $p > 0.05$ ); Likewise, no differences were found in pregnancy and delivery rates ( $p > 0.05$ ) between groups. However, the GG genotype showed the highest ovulatory rate, prolificacy and fecundity ( $p < 0.05$ ), with respect to the AA and sG groups. Although no differences were found in the manifestation of estrus, return to estrus, pregnancy and delivery in females of the genotypes studied, the sheep of the GG

mutated genotype presented 1.22 and 1.72 more luteal bodies and, 0.8 and 1.0 more lambs per sheep, which those produced by the wild genotype AA and sG group, respectively.

### 3.3 INTRODUCCIÓN

Los ovinos tienen una gran variación genética en tasa ovulatoria y prolificidad (Hanrahan *et al.* 2004; Fabre *et al.* 2006). Esta variación se asocia a ciertos genes relacionados con la actividad reproductiva. Los genes de la fecundidad (*Fec*) pertenecen a la familia del TGF $\beta$  (Juengel *et al.* 2002; Hanrahan *et al.* 2004; Fabre *et al.* 2006); por ejemplo, el gen *GDF9* o *FecG* se encuentra en el cromosoma 5 y está formado por dos exones separados por un intrón (Sadighi *et al.* 2002). Este gen interviene en la proliferación y organización de las células de la teca que rodean al folículo (Strauss y Williams 2019), promueve la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y participa activamente en la foliculogénesis (Juengel *et al.* 2002; Hanrahan *et al.* 2004). Además, este gen promueve la expresión de los receptores a nivel folicular a la hormona folículo estimulante (Orisaka *et al.* 2006).

Aunque se han reportado 11 mutaciones en la región codificante del gen *GDF9*, solo cinco tienen un efecto significativo en la tasa ovulatoria y prolificidad de algunas razas de ovinos prolíficas, éstas son: *FecG<sup>H</sup>* (alta fertilidad, Hanrahan *et al.* 2004), *FecT<sup>T</sup>* (Toka, Nicol *et al.* 2009), *FecG<sup>E</sup>* (Embrapa, Silva *et al.* 2010), *FecG<sup>V</sup>* (Vecaria, Souza *et al.* 2014) y *FecG<sup>NWS</sup>* o *FecG<sup>F</sup>* (oveja blanca noruega o Finnish, Våge *et al.* 2013; Mullen y Hanrahan 2014). En la mayoría de estos polimorfismos, las ovejas con una copia del gen *GDF9* o heterocigotas tienen un incremento en tasa ovulatoria y prolificidad; mientras que las

ovejas con dos copias de este gen u homocigotas son infértiles, debido a una hipoplasia ovárica y a fallas primarias en la foliculogénesis (Juengel *et al.* 2002; Hanrahan *et al.* 2004). No obstante, la oveja Santa Inés, con dos copias u homocigota a la mutación *FecGE*, presentó un incremento en tasa ovulatoria del 82 % y una prolificidad del 58 %, en tanto que las ovejas heterocigotas tuvieron un comportamiento similar con las silvestres en tasa ovulatoria y prolificidad (Silva *et al.* 2010).

En México, las ovejas de las razas de pelo, la Pelibuey es la de mayor distribución debido a su rusticidad, resistencia a parásitos, buena habilidad materna y estacionalidad reproductiva reducida (Valencia *et al.* 2006; De la Isla-Herrera *et al.* 2010; Macías-Cruz *et al.* 2015); sin embargo, esta raza presenta una tasa ovulatoria ( $1.3 \pm 0.16$  a  $1.8 \pm 0.14$ ) y prolificidad ( $1.23 \pm 0.05$  a  $1.53 \pm 0.06$ ) muy variable (Cansino-Arroyo *et al.* 2009; De la Isla-Herrera *et al.* 2010; Martínez-Rojero *et al.* 2011). Al respecto, únicamente dos estudios del polimorfismo *FecGE*, en ovejas Santa Inés (Silva *et al.* 2010) y Pelibuey (Pérez-Ruiz *et al.* 2020) relacionados con estas características reproductivas se han realizado pero no se ha investigado sobre la asociación de los genotipos de este polimorfismo con la respuesta en variables reproductivas en la oveja Pelibuey en la época de anestro. Esta información generada podrá ser utilizada en programas de mejoramiento genético, dirigidos para mejorar la eficiencia reproductiva y la rentabilidad de los rebaños. Por ello, el objetivo de esta investigación fue evaluar la influencia de los genotipos del polimorfismo *FecGE* del gen *GDF9* en la respuesta natural de la manifestación a estro, retorno a estro, tasa ovulatoria, gestación, parición, prolificidad y fecundidad en ovejas Pelibuey, durante la época de anestro.

### 3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.4.1 Ubicación, ovejas y alimentación

El presente estudio se desarrolló durante mayo-junio 2018 en la unidad de producción agropecuaria “El Gargaleote” propiedad de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en el municipio de Tamuín, S.L.P., México (22°00'04" N, 98°39'05" O y altitud de 40 m). El clima de este lugar es Aw''o (e) descrito como cálido subhúmedo con lluvias en verano, temperatura media anual de 25.8 °C y precipitación media anual de 882.8 mm (García 2004). El tipo de vegetación de este lugar es selva baja caducifolia, selva media y pastizal cultivado (EMM24SLP 2009). En este estudio se utilizaron 42 ovejas de la raza Pelibuey multíparas con registros reproductivos individuales. La edad promedio de las ovejas fue de  $6.26 \pm 0.77$  años y un peso corporal de  $43.35 \pm 2.73$  kg. Durante el día, las ovejas pastorearon una pradera de pasto Caymán® (13.5 % de proteína, híbrido de *Brachiaria cv. CIAT BR02/1752*). Además, recibieron 1.2 kg de alimento balanceado dos veces día<sup>-1</sup>. Este alimento balanceado contenía 15 % de PC y 2.9 Mcal de energía metabolizable kg<sup>-1</sup>. Todos los animales tuvieron libre acceso al agua limpia durante todo el experimento. Una vez que el manejo reproductivo de las ovejas en estudio concluyó, todas se alimentaron con maíz ensilado *ad libitum* más alimento balanceado a razón de 1.2 kg oveja<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, antes descrito.

El manejo de los animales se realizó considerando los requerimientos éticos para la utilización de animales en experimentación, recomendados por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) (SAGARPA, 2001) sobre especificaciones técnicas, para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, en concordancia a las

regulaciones para el uso y cuidado de animales de investigación, aprobado por el Consejo General Académico de Colegio de Postgraduados, México (Colpos, 2016). La detección de estros, monta natural y tasa ovulatoria se evaluaron en los meses de mayo (día 25) a junio (día 7) de 2018, periodo de tiempo considerado como época de anestro estacional en ovejas de pelo (De la Isla-Herrera *et al.* 2010; Gastelum-Delgado *et al.* 2015). Durante esta investigación, la temperatura máxima promedio fue de 36 °C y una humedad relativa de 68 % (Figura 1).

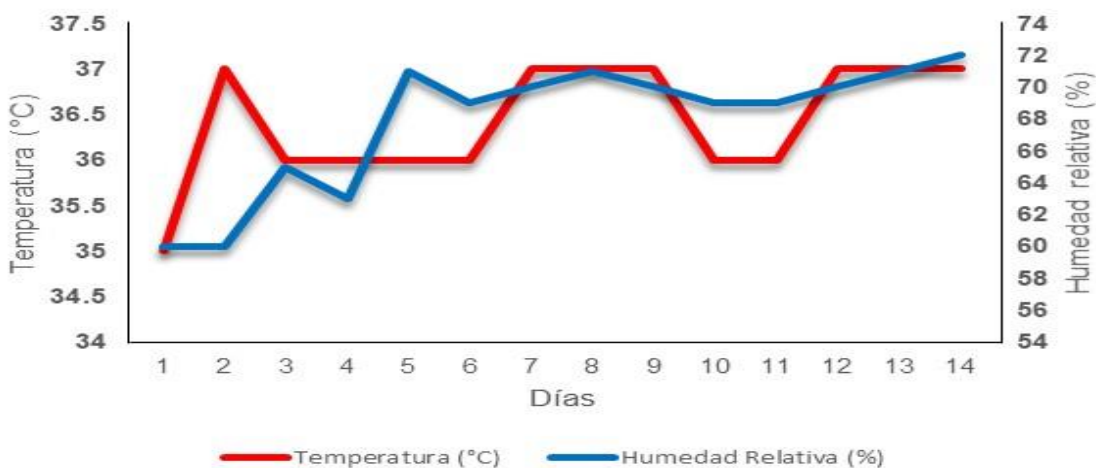


Figura 5. Temperatura (°C) y humedad relativa (%) registradas en el área de estudio durante la investigación: 25 de mayo (día 1) a 7 de junio (día 14).

### 3.4.2 Procesamiento de muestras y secuenciación

Las muestras de sangre colectadas en tarjetas Whatman™ FTA™ (WB 120055, GE Healthcare®, Reino Unido) fueron procesadas de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El exón 2 del gen *GDF9* se amplificó mediante la Reacción Cadena de Polimerasa (PCR) y la mezcla de reacción para la PCR se elaboró en un volumen final fina de 12.5 µL, con 6.25 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2X (Promega® Madison, WI, E.U.A.), 0.625 µL de cada primer (For-5'-GGAGAAAAGGGACAGAAGC-3' y Rev- 5'-

ACGACAGGTACACTTAGT-3' reportados por Silva *et al.* 2010), más 5 µL de dihidrato de trehalosa al 10% (Merck® KGaA 64271, Darmstadt, Alemania). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial, 93 °C, tres min, más 35 ciclos (desnaturalización, 93 °C, 40 s; alineamiento, 56 °C, 40 s y extensión, 72 °C, 40 s) y extensión final, 72 °C, por cinco min. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Biología Molecular de uso común del Posgrado de Fitosanidad, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, Texcoco, Estado de México. Los productos PCR una vez obtenidos, se enviaron a la empresa MacroGen® (Seúl, Corea del Sur) para su limpieza y secuenciación.

#### 3.4.3 Análisis bioinformático de secuencias y genotipado

La calidad de las secuencias se analizó con el programa Sequencher® versión 5.4.6 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, E.U.A. <http://www.genecodes.com>). De las secuencias obtenidas, se realizó una búsqueda en Nucleotide BLAST del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) y se seleccionaron las que tuvieron una similitud (AF078545.2 y HE866499.1) mayor con las de nuestro estudio. Posteriormente, se realizó un alineamiento de dichas secuencias, con el algoritmo MUSCLE® (Edgar, 2004) en MEGA 7® (Kumar *et al.* 2016), para determinar el grado de similitud, detectar polimorfismos y su genotipado. El tamaño de la muestra se determinó mediante el Nomograma de Altman (Petrie y Watson 2013) y las ovejas se distribuyeron de acuerdo a los genotipos del polimorfismo *FecG<sup>E</sup>* del gen *GDF9*, encontrados; GG = genotipo mutado o Embrapa (n = 14), AA = genotipo silvestre (n =14) y el grupo sG = sin gen de



la prolificidad ( $n = 14$ ). Es importante mencionar que en este estudio no se encontraron ovejas con el genotipo heterocigoto (GA).

#### 3.4.4 Manejo sanitario

Las ovejas se desparasitaron con Biodec F<sup>®</sup> (1 g de Ivermectina y 10 g de Clorsulón, en una dosis de Ivermectina  $0.2 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal y Clorsulón  $2.0 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal, Bio Zoo, Jalisco, México), se vitaminaron con 500,000 UI de vitamina A, 75,000 UI de vitamina D<sub>3</sub> y 50 UI de vitamina E (Viganto<sup>®</sup>, Bayer Korea Ltd, Corea del Sur) y se vacunaron con Bovimune<sup>®</sup> Clostri 7 + HS 7 y Bovimune Single Shot<sup>®</sup> (2.5 mL por animal de cada vacuna, Lapisa, La Piedad, Michoacán, México) contra las principales enfermedades de tipo clostridial, respiratorias y salmonelosis.

#### 3.4.5 Inducción y sincronización del estro y ovulación

Para uniformizar el inicio al estro y ovulación en las ovejas de cada genotipo y del grupo sin gen, se realizó una inducción y sincronización del estro con un dispositivo intra vaginal impregnado de progesterona natural de liberación controlada (CIDR<sup>®</sup> con 0.3 g de Progesterona, Zoetis, Hamilton, Nueva Zelanda), durante nueve días. Al séptimo día, se realizó la aplicación de un mL de prostaglandina (Lutalyse<sup>®</sup>, 5 mg de Dinoprost trometamina, Zoetis, Girona, España), más 300 UI de eCG (Folligon<sup>®</sup> Intervet, Boxmeer, Holanda) vía intramuscular. Al noveno día se retiró el CIDR y 24 h después se aplicaron 100  $\mu\text{g}$  de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH, Ovalyse<sup>®</sup>, laboratorio Zoetis) vía intramuscular. Cabe mencionar que después de la remoción del progestágeno, todas las ovejas manifestaron conducta estral inducida; sin embargo, para fines de la investigación, a ninguna se le dio servicio de monta; se esperó al retorno a

estro para evaluar la influencia de los genotipos del polimorfismo *FecGE* en la respuesta natural de las variables reproductivas de las ovejas de este estudio.

#### 3.4.6 Detección de estros, monta natural controlada y retorno a estro

Catorce días después de que las ovejas manifestaron signos externos de estro, debido a la pre-inducción, sincronización del estro y ovulación con influencia de los hormonales exógenos, nuevamente se detectaron estros. Estas detecciones se realizaron durante 60 min por la mañana (8:00 a 9:00 h) y 60 min por la tarde (17:00 a 18:00 h) con la ayuda de un carnero fértil provisto de un mandil. Una oveja en estro fue aquella que se quedaba completamente inmóvil y permitía la monta del carnero. El empadre se realizó mediante dos montas naturales controladas, al estro y la otra 12 h después. Una vez terminadas las montas, los carneros permanecieron separados de las ovejas por 14 días. En el día 15 después de la monta natural, a los carneros se les colocó un mandil para revisar el retorno al estro; el cual se realizó 60 min por la mañana (8:00 a 9:00 h) y 60 min por la tarde (17:00 a 18:00 h) durante un periodo de seis días. Se consideró que una oveja retornó a estro, cuando ésta permaneció inmóvil totalmente y aceptó la monta del carnero.

#### 3.4.7 Tasa ovulatoria

La medición de la tasa ovulatoria se realizó mediante el conteo de cuerpos lúteos (CL) presentes en la superficie ovárica, siete días después de la monta natural mediante el uso de un ecógrafo portátil (HandScan V8® Shenzhen Sunway Medical Device Co. Ltd. China), provisto con un transductor rectal de 7.5 MHz.

#### 3.4.8 Gestación

El porcentaje de gestación es el número de ovejas gestantes entre el total de ovejas del tratamiento multiplicada por 100. Esta variable se determinó 40 días después del servicio en todas las ovejas consideradas en este estudio con la ayuda de un ecógrafo portátil (UMS-900® Universal Medical System Inc., NY, E.U.A.) provisto con un transductor rectal de 3.5-7.0 MHz.

#### 3.4.9 Parición

El porcentaje de parición corresponde al número de ovejas que parieron entre el total de ovejas en el tratamiento multiplicado por 100. Esta variable se determinó al momento del parto.

#### 3.4.10 Prolificidad

La prolificidad es el número total de corderos nacidos entre el total de ovejas paridas y se determinó al momento del parto.

#### 3.4.11 Fecundidad

La fecundidad es el número total de corderos nacidos entre el número total de ovejas en el tratamiento o expuestas al empadre y se determinó al parto.

#### 3.4.12 Análisis estadístico

Las variables incidencia de estro y retorno a estro se analizaron mediante el procedimiento GENMOD (SAS 2013) de regresión binomial negativa, para evaluar el efecto del genotipo. Los porcentajes de gestación y parición se analizaron con el procedimiento FREQ (SAS 2013), mediante el estadístico de Chi-cuadrada. Las variables

tasa ovulatoria, prolificidad y fecundidad se analizaron con el procedimiento GLM (SAS 2013), mediante la comparación de medias por Tukey.

### 3.5 RESULTADOS

#### 3.5.1 Incidencia y retorno al estro

Todas las ovejas de los genotipos GG y AA del polimorfismo *FecGE* y del grupo sG manifestaron conducta estral ( $p>0.05$ ), pero ninguna oveja de los tres grupos estudiados mostró retorno a estro ( $p>0.05$ ) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Incidencia y retorno al estro en los genotipos del polimorfismo *FecGE* en el gen *GDF9* en ovejas Pelibuey.

| Genotipo       | N  | Estro (%)          | Retorno a estro (%) |
|----------------|----|--------------------|---------------------|
| Embrapa (GG)   | 14 | 100.0 <sup>a</sup> | 0.0 <sup>a</sup>    |
| Silvestre (AA) | 14 | 100.0 <sup>a</sup> | 0.0 <sup>a</sup>    |
| Sin gen (sG)   | 14 | 100.0 <sup>a</sup> | 0.0 <sup>a</sup>    |

<sup>a</sup> Misma letra en la misma columna, indica que no hay significancia ( $p>0.05$ ). n = número de ovejas.

#### 3.5.2 Tasa ovulatoria

El genotipo GG presentó la tasa ovulatoria mayor ( $3.00\pm 0.18$ ;  $p<0.05$ ) con respecto al genotipo AA ( $1.78\pm 0.15$ ) y al grupo sG ( $1.28\pm 0.16$ ), respectivamente; sin embargo, entre los dos últimos grupos no hubo diferencia estadística ( $p>0.05$ ) (Figura 6). La edad ( $p=0.31$ ) y el peso corporal ( $p=0.33$ ) de las ovejas, no tuvieron efecto en esta variable.

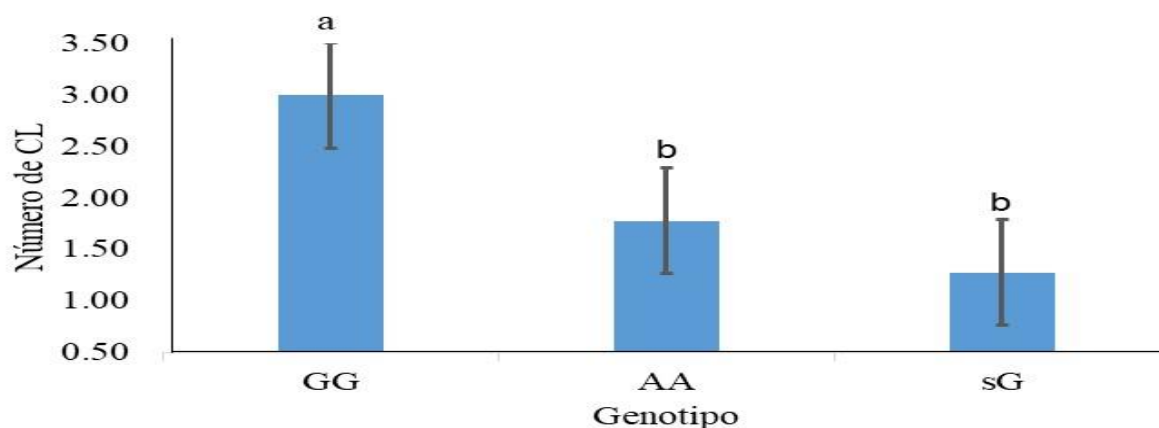


Figura 6. Tasa ovulatoria en los genotipos del polimorfismo FecG<sup>E</sup> del gen GDF9 en ovejas Pelibuey (Media ± E.E.). <sup>a, b</sup> Letra diferente en las barras, indica diferencia ( $p < 0.05$ ). CL = cuerpos lúteos GG = Embrapa, AA = Silvestre y sG = sin gen. E.E. = error estándar.

### 3.5.3 Porcentaje de gestación y parición

En los tres grupos evaluados, para el porcentaje de gestación y parición no se encontraron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) (Cuadro 5). Los promedios generales para la gestación y parición fueron 88.1 % y 71.4 %, respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentaje de gestación y parición en los genotipos del polimorfismo FecG<sup>E</sup> del gen GDF9 en ovejas Pelibuey.

| Genotipo       | n  | Gestación (%)      | Parición (%)      |
|----------------|----|--------------------|-------------------|
| Embrapa (GG)   | 14 | 100.0 <sup>a</sup> | 85.7 <sup>a</sup> |
| Silvestre (AA) | 14 | 85.7 <sup>a</sup>  | 71.4 <sup>a</sup> |
| Sin gen (sG)   | 14 | 78.5 <sup>a</sup>  | 57.1 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> Misma letra en la misma columna, indica que no hay diferencia estadística ( $p > 0.05$ ). n = número de ovejas.

### 3.5.4 Prolificidad y fecundidad

La prolificidad del genotipo Embrapa fue mayor con respecto al genotipo Silvestre y grupo sin Gen ( $p < 0.05$ ), pero no existió diferencia significativa entre los grupos Silvestre y sin Gen ( $p > 0.05$ ) (Cuadro 6). La prolificidad general promedio fue de 1.65 corderos por oveja. Al igual, la fecundidad fue mayor en el genotipo Embrapa con respecto al genotipo Silvestre y el grupo sin Gen ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 6). Sin embargo, tampoco hubo diferencias entre los grupos Silvestre y sin Gen ( $p > 0.05$ ) (Cuadro 6). La fecundidad general promedio fue de 1.21 corderos por oveja.

Cuadro 6. Prolificidad y fecundidad en los genotipos del polimorfismo *FecGE* del gen *GDF9* en ovejas Pelibuey (Media $\pm$ E.E.).

| Genotipo       | n  | Prolificidad               | Fecundidad                 |
|----------------|----|----------------------------|----------------------------|
| Embrapa (GG)   | 14 | 2.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup> | 1.8 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup> |
| Silvestre (AA) | 14 | 1.4 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup> | 1.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup> |
| Sin gen (sG)   | 14 | 1.4 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup> | 0.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup> |

<sup>a, b</sup> Letra diferente en la misma columna, indica diferencia ( $p < 0.05$ ). n = número de ovejas. E.E. = error estándar.

## 3.6 DISCUSIÓN

La inducción y sincronización del estro en todas las ovejas de este estudio se llevó a cabo en el mes de mayo, considerado como época de anestro estacional (De la Isla-Herrera *et al.* 2010; Gastelum-Delgado *et al.* 2015); la cual se caracteriza por una ausencia de la actividad sexual (Rosa y Bryant 2003). A pesar de ser una época no favorable para la reproducción en los ovinos, la incidencia natural de estros en las ovejas Pelibuey en los tres grupos evaluados fue del 100 %. Los resultados de este estudio, son

similares a lo reportado en el Altiplano Mexicano en ovejas de la misma raza, cuando evaluaron la actividad reproductiva de la oveja Pelibuey a través del año (Valencia *et al.* 2006; Arroyo *et al.* 2007). Así mismo, Macías-Cruz *et al.* (2015) en la misma raza ovina, pero en el noroeste de México, reportaron que el 95 % de las ovejas manifestaron estro en primavera. En general, con todos estos resultados indicados y lo encontrado en este estudio, se sugiere que las ovejas Pelibuey son capaces de manifestar conducta estral en la época de anestro estacional. Por el contrario, la inducción de la actividad reproductiva en ovejas de lana, Corriedale y Romney-Dorset, sólo el 65.5 y 77.8 % de las ovejas, respectivamente, manifestaron estro durante la época de anestro estacional (Ungerfeld 2009; Martínez *et al.* 2015).

En cuanto al retorno al estro para los tres grupos evaluados, posterior a la monta, ninguna oveja mostró dicho retorno. El éxito con la ausencia de retornos al estro probablemente se debió a que se dieron dos montas naturales controladas; una a la detección del estro y otra 12 h después; esta práctica incrementa la fertilidad en ovejas (Fernández *et al.* 2006). Siete días después de las montas naturales, se midió la tasa ovulatoria en los genotipos (GG y AA) del polimorfismo *FecGE* en el gen *GDF9* y el grupo sin gen encontrando que el genotipo GG presentó la tasa ovulatoria más alta ( $3.00 \pm 0.18$ ) comparada con la del genotipo AA y el grupo sG; en tanto que no hubo diferencia significativa entre los grupos AA y sG. La edad y peso corporal de las ovejas no influyeron en esta variable ( $p > 0.05$ ). La tasa ovulatoria del genotipo GG del polimorfismo *FecGE* en las ovejas de este estudio fue similar al genotipo reportado en la oveja Santa Inés (Silva *et al.* 2010). La alta tasa ovulatoria en el genotipo GG del polimorfismo *FecGE* en este estudio, posiblemente se debió a que a nivel folicular, hubo una mejor proliferación y

diferenciación de las células de la granulosa, las cuales son necesarias para el metabolismo del ovocito (Otsuka *et al.* 2011); esto quizá ayudó a tener una mejor supervivencia y crecimiento de los folículos. Del mismo modo, posiblemente se promovió una mayor expresión del receptor folicular a la hormona folículo estimulante (FSH) en células de la granulosa para que favorecieran el crecimiento del folículo antral dependiente de esta gonadotropina (Orisaka *et al.* 2006; Otsuka *et al.* 2011). Todos estos factores en conjunto, posiblemente propiciaron un mejor microambiente para obtener un mayor crecimiento folicular, los cuales liberaron una mayor cantidad de ovocitos (Fabre *et al.* 2006), lo que resultó en una mayor cantidad de cuerpos lúteos en el ovario.

En cuanto al porcentaje de preñez, no se tuvieron diferencias en los tres grupos de estudio; sin embargo, en promedio, el 88 % (37 de 42) de las ovejas resultaron gestantes y el 71.4 % (30 de 42) de ellas parieron. Es importante indicar, que el apareamiento se realizó a finales de mayo y la tasa ovulatoria se midió en la primera semana de junio de 2018; al respecto, la temperatura diurna máxima promedio fue de 36 °C y la humedad relativa de 68 % durante el estudio. Posiblemente la temperatura y humedad relativa altas, tuvieron un efecto en el desarrollo embrionario y la gestación; tal y como lo reportaron Macías-Cruz *et al.* (2016) en la oveja Pelibuey, bajo estrés calórico crónico durante el verano en el noroeste de México a una temperatura similar de 36.1°C y humedad relativa de 32.4 %. Por su parte, ovejas Merino expuestas a una temperatura de 32 °C durante el apareamiento, mostraron una reducción del 12 % en la gestación a los 100 días (Kleemann y Walker 2005). Esta disminución de la gestación pudiera estar asociada con la afectación de la función ovárica, reflejándose en una reducción en la producción de progesterona (<2 ng / mL) en los días 25 y 65, estradiol-17β (2.6 pg/mL)



en los días 65 a 85 y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; 0.9 ng/mL) en el día 65 de la gestación. El estradiol-17 $\beta$  y el VEGF están implicados en el desarrollo placentario y, una exposición al estrés calórico podría afectar el desarrollo vascular placentario normal y contribuir a un desarrollo placentario insuficiente, afectando la supervivencia del embrión o feto (Dixon *et al.* 2007; Marai *et al.* 2008; Macías-Cruz *et al.* 2016).

En referencia a la prolificidad, esta variable tuvo un promedio de  $1.6\pm 0.1$  corderos por oveja; este valor fue similar al reportado en ovejas de la raza Santa Inés (1.7; Silva *et al.* 2010) y Rahmani y Ossimi (1.8; El-Halawany *et al.* 2018); sin embargo, fue mayor al reportado en ovejas Barbarine (1.2), Queue Fine de L'Ouest (1.1) y Noire de Thibar (1.3) (Vacca *et al.* 2010). La prolificidad exhibida por el genotipo GG ( $2.1\pm 0.0$ ) fue 0.8 y 1.0 más corderos por oveja que los grupos AA y sG. Es importante señalar, que 11 de 14 ovejas del genotipo GG tuvieron parto gemelar y sólo una tuvo parto triple. Este hallazgo indica que el genotipo homocigoto GG del polimorfismo *FecGE* tiene una gran influencia en la prolificidad de ovejas Pelibuey, lo cual confirma que los ovocitos producidos por esta raza son viables y fértiles (Silva *et al.* 2010). Un patrón similar de expresión alélica para estas características reproductivas se encontró en las ovejas Santa Inés (*FecGE*), Blanca Noruega (*FecGNWS*) y Finnsheep (*FecGF*) (Silva *et al.* 2010; Våge *et al.* 2013; Mullen y Hanrahan 2014); razas fértiles con dos copias del gen *GDF9* u homocigotas. Por el contrario, en las ovejas Belclare y Cambridge (*FecGH*), Thoka islandesa (*FecGT*) e Ile de France (*FecGV*) con una copia mutada o heterocigotas incrementan la prolificidad, mientras que con dos copias mutadas u homocigotas presentan hipoplasia uterina y falla ovárica primaria (Hanrahan *et al.* 2004; Nicol *et al.* 2009; Souza *et al.* 2014).

Finalmente, el valor elevado de la tasa ovulatoria encontrado en este estudio en el genotipo homocigoto GG, fue debido a la gran cantidad de ovocitos liberados para su fertilización (Fabre *et al.* 2006); lo cual se reflejó en una mayor prolificidad y fecundidad de las ovejas Pelibuey con doble copia del gen *GDF9*. Este hallazgo debido a la variante génica *FecG<sup>F</sup>* encontrada en las ovejas Pelibuey de este estudio, reportada previamente por Silva *et al.* (2010; Santa Inés) y Pérez-Ruiz *et al.* (2020; Pelibuey), puede ser utilizada ampliamente en programas masivos de reproducción y mejoramiento genético ovino (selección asistida por genes), para incrementar de forma natural la tasa ovulatoria y prolificidad, sin necesidad de utilizar fármacos que incrementan los costos para dicho fin.

### 3.7 CONCLUSIONES

Todas las ovejas de este estudio manifestaron conducta estral y ninguna mostró retorno a estro durante la época de anestro estacional. Las ovejas con el genotipo mutado (GG) del polimorfismo *FecG<sup>F</sup>* presentaron 1.22 y 1.72 más cuerpos lúteos que el genotipo silvestre (AA) y el grupo sin el gen (sG), respectivamente. Se tuvo un promedio de 88.1 % de gestación y un 71.4 % de parición, sin encontrar diferencia estadística entre los grupos de estudio. La prolificidad y fecundidad del genotipo GG representó 0.8 y 1.0 más corderos por oveja con respecto a los grupos AA y sG. No obstante, se requiere de estudios adicionales con un número de ovejas mayor, utilizando el genotipo GG del polimorfismo *FecG<sup>F</sup>* durante la época reproductiva y de esta manera generar más información referente al efecto genético en la respuesta natural de las variables reproductivas de la oveja Pelibuey.

### 3.8 LITERATURA CITADA

- Arroyo, L. J., Gallegos-Sánchez, J., Villa-Godoy, A., Berruecos, J. M., Perera, G., & Valencia, J. (2007). Reproductive activity of Pelibuey and Suffolk ewes at 19° north latitude. *Animal Reproduction Science*, 102(1–2), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.09.025>
- Cansino-Arroyo, G., Herrera-Camacho, J., & Aké-López, J. (2009). Tasas de concepción, fertilidad y prolificidad en ovejas de pelo alimentadas con dietas enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*, 25(1), 181–185. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0186-29792009000200008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792009000200008&lng=es&tlng=es)
- Colpos. (2016). Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la investigación en el Colegio de Postgraduados. In *Reglamento para el uso y cuidado de animales en experimentación* (pp. 1–16).
- De la Isla-Herrera, G., Aké-López, J. R., Ayala-Burgos, A., & González-Bulnes, A. (2010). Efecto de la condición corporal y la época del año sobre el ciclo estral, estro, desarrollo folicular y tasa ovulatoria en ovejas Pelibuey mantenidas en condiciones de trópico. *Veterinaria México*, 41(3), 167–175. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-50922010000300001&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922010000300001&lng=es&tlng=es)
- Dixon, A. B., Knights, M., Winkler, J. L., Marsh, D. J., Pate, J. L., Wilson, M. E., ... Inskip, E. K. (2007). Patterns of late embryonic and fetal mortality and association with several factors in sheep. *Journal of Animal Science*, 85(5), 1274–1284. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-129>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- El-Halawany, N., Kandil, M. O., Shawky, A. A., Al-Tohamy, A. F., El-Sayd, A. Y., Abdel-Shafy, H., ... Jiang, Z. (2018). Investigating the effect of GDF9, BMP15, BMP6 and BMP1B polymorphisms on Egyptian sheep fecundity and their transcripts expression in ovarian cells. *Small Ruminant Research*, 165(1), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.06.010>
- EMM24SLP. (2009). Tamuín, San Luís Potosí, México. *EMM24SLP (Enciclopedia de Los Municipios de San Luís Potosí)*, En Línea. Retrieved from <http://siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/EMM24sanluispotosi/municipios/24040a.html%0ANOMENCLATURA>
- Fabre, S., Pierre, A., Mulsant, P., Bodin, L., Di Pasquale, E., Persani, L., ... Monniaux, D.

- (2006). Regulation of ovulation rate in mammals: Contribution of sheep genetic models. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-20>
- Fernández, A. D., Ibáñez, W., & De Mora, M. (2006). Efecto del momento del servicio, número de servicio y período entre servicios, sobre la fertilidad de ovejas Merino sincronizadas con servicio a corral. *Producción Ovina*, 18, 49–55. Retrieved from [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_ovina/produccion\\_ovina/62-Fernandez\\_Abella\\_3.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina/62-Fernandez_Abella_3.pdf)
- García, E. (2004). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. (I. de Geografía-UNAM, Ed.) (Quinta edi). México. Retrieved from [http://www.igeograf.unam.mx/sigg/utilidades/docs/pdfs/publicaciones/geo\\_siglo21/serie\\_lib/modific\\_al\\_sis.pdf](http://www.igeograf.unam.mx/sigg/utilidades/docs/pdfs/publicaciones/geo_siglo21/serie_lib/modific_al_sis.pdf)
- Gastelum-Delgado, M. A., Avendaño-Reyes, L., Álvarez-Valenzuela, F. D., Correa-Calderón, A., Meza-Herrera, C. A., Mellado, M., & Macías-Cruz, U. (2015). Circannual estrous behavior in Pelibuey ewes under arid conditions of Northwestern of Mexico. *Revista Mexicana En Ciencias Pecuarias*, 6(1), 109–118. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v6n1/v6n1a8.pdf>
- Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R., & Galloway, S. M. (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 70(4), 900–909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023093>
- Juengel, J. L., Hudson, N. L., Heath, D. A., Smith, P., Reader, K. L., Lawrence, S. B., ... McNatty, K. P. (2002). Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep 1. *Biology of Reproduction*, 67(6), 1777–1789. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007146>
- Kleemann, D. O., & Walker, S. K. (2005). Fertility in South Australian commercial Merino flocks: relationships between reproductive traits and environmental cues. *Theriogenology*, 63(9), 2416–2433. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.052>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(1), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Macías-Cruz, U., Sánchez-Estrada, T. J., Gastelum-Delgado, M. A., Avendaño-Reyes, L., Correa-Calderón, A., Álvarez-Valenzuela, F., ... Mellado, M. (2015). Actividad reproductiva estacional de ovejas Pelibuey bajo condiciones áridas de México. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 47, 381–386.
- Macías-Cruz, Ulises, Gastelum, M. A., Álvarez, F. D., Correa, A., Díaz, R., Meza-Herrera,

- C. A., ... Avendaño-Reyes, L. (2016). Effects of summer heat stress on physiological variables, ovulation and progesterone secretion in Pelibuey ewes under natural outdoor conditions in an arid region. *Animal Science Journal*, 87(3), 354–360. <https://doi.org/10.1111/asj.12430>
- Marai, I. F. M., El- Darawany, A. A., Fadiel, A., & Abdel-Hafez, M. A. M. (2008). Reproductive performance traits as affected by heat stress and its alleviation in sheep. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 8(3), 209–234.
- Martínez-Rojero, R. D., Santamaría-Reyna, L., Torres-Hernández, G., Mastache-Lagunas, A. A., & Michel-Aceves, A. C. (2011). Evaluación de la fertilidad y prolificidad en ciclos reproductivos de ocho meses durante tres estaciones en ovejas Pelibuey en el trópico seco mexicano. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 21(5), 383–387. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95919362001>
- Martinez, M. F., McLeod, B., Tattersfield, G., Smaill, B., Quirke, L. D., & Juengel, J. L. (2015). Successful induction of oestrus, ovulation and pregnancy in adult ewes and ewe lambs out of the breeding season using a GnRH+progesterone oestrus synchronisation protocol. *Animal Reproduction Science*, 155, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.01.010>
- Mullen, M. P., & Hanrahan, J. P. (2014). Direct evidence on the contribution of a missense mutation in GDF9 to variation in ovulation rate of Finnsheep. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095251>
- Nicol, L., Bishop, C. S., Pong-Wong, R., Bendixen, C., Holm, L.-E., Rhind, M. S., & Mcneilly, S. A. (2009). specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *Reproduction*, 138(6), 921–933. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0193>
- Orisaka, M., Orisaka, S., Jiang, J.-Y., Craig, J., Wang, Y., Kotsuji, F., & Tsang, B. K. (2006). Growth Differentiation Factor 9 Is Antiapoptotic during Follicular Development from Preantral to Early Antral Stage. *Molecular Endocrinology*, 20(10), 2456–2468. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0357>
- Otsuka, F., McTavish, K. J., & Shimasaki, S. (2011). Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Molecular Reproduction and Development*. <https://doi.org/10.1002/mrd.21265>
- Pérez-Ruiz, E., Gallegos-Sánchez, J., Cortez-Romero, C., Segura-León, Obdulia L. Salinas-Ruíz, J., & Salazar-Ortiz, J. (2020). FecGE mutation in Pelibuey sheep. *Animal Genetics*, (January). <https://doi.org/10.1111/age.12912>
- Petrie, A., & Watson, P. (2013). *Statistics for Veterinary and Animal Science*. (WILEY-BLACKWELL, Ed.) (Third Edit). United Kingdom. Retrieved from [www.wiley.com/go/petrie/statisticsforvets](http://www.wiley.com/go/petrie/statisticsforvets)

- Rosa, H. J. D., & Bryant, M. J. (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*, 48(3), 155–171. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00038-5)
- Sadighi, M., Bodensteiner, K. J., Beattie, A. E., & Galloway, S. M. (2002). Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Animal Genetics*, 33(3), 244–245. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2002.t01-11-00876.x>
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca, y Alimentación,). (2001). Norma oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de La Federación*, 22 Agosto, 107–165. Retrieved from [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999\\_220801.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf)
- SAS Institute Inc., Cary, NC, U. (2013). *SAS 9.4 Statements* ®. (S. Institute, Ed.) (9.4 Statem). Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download;jsessionid=239E4F5E2E39CF2164C9BAD96900EA01?doi=10.1.1.353.6870&rep=rep1&type=pdf>
- Silva, B. D. M., Castro, E. A., Souza, C. J. H., Paiva, S. R., Sartori, R., Franco, M. M., ... Melo, E. O. (2010). A new polymorphism in the growth and differentiation factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Animal Genetics*, 42, 89–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02078.x>
- Souza, C. J. H., McNeilly, A. S., Benavides, M. V., Melo, E. O., & Moraes, J. C. F. (2014). Mutation in the protease cleavage site of GDF9 increases ovulation rate and litter size in heterozygous ewes and causes infertility in homozygous ewes. *Animal Genetics*, 45(5), 732–739. <https://doi.org/10.1111/age.12190>
- Strauss, J. F., & Williams, C. J. (2019). Ovarian Life Cycle. In J. S. R. B. A. Gargiulo (Ed.), *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management: Eighth Edition* (Eighth Edi, pp. 167-205.e9). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00008-1>
- Ungerfeld, R. (2009). The induction of oestrus in ewes during the non-breeding season using pre-used CIDRs and oestradiol-17 $\beta$  treatment. *Small Ruminant Research*, 84(1–3), 129–131. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.06.011>
- Vacca, G. M., Dhaouadi, A., Rekik, M., Carcangiu, V., Pazzola, M., & Dettori, M. L. (2010). Prolificacy genotypes at BMPR 1B, BMP15 and GDF9 genes in North African sheep breeds. *Small Ruminant Research*, 88, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.11.005>
- Våge, I. D., Husdal, M., Kent, P. M., Klemetsdal, G., & Boman, A. I. (2013). A missense

mutation in growth differentiation factor 9 ( GDF9 ) is strongly associated with litter size in sheep. *BMC Genetics*, 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-1>

Valencia, J., Porras, A., Mejía, O., Berruecos, J. M., & Trujillo, J. (2006). Reproductive Activity of Pelibuey Ewe During the Anoestrus Season : *Revista Científica, FCV-LUZ*, XVI(2), 136–141.

## **CAPÍTULO 4. POLIMORFISMOS Y GENOTIPOS EN *GDF9* Y *BMP15* MEDIANTE EL SISTEMA DE AMPLIFICACIÓN REFRACTARIA DE MUTACIONES CON TETRA-INICIADORES EN OVEJAS PELIBUEY**

Canuto Muñoz García, Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2020

### **4.1 RESUMEN**

Los polimorfismos de una sola base (SNP) son variaciones que tienen una amplia distribución en el genoma y, en estudios genéticos, los SNP permiten identificar variantes alélicas relacionadas a características de importancia económica en la producción ovina. No obstante, la identificación de SNP y sus genotipos a través de la secuenciación tiene costos elevados y utilizan material y equipo especializado. El objetivo de esta investigación fue identificar los polimorfismos y sus genotipos en los genes *GDF9* y *BMP15* a través del Sistema de Amplificación Refractaria de Mutaciones, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Tetra-iniciadores (T-ARSM-PCR) en ovejas Pelibuey. La extracción y amplificación del DNA de los genes *BMP15* y *GDF9* se realizó a partir de muestras sanguíneas contenidas en tarjetas Whatman™ FTA™ de 60 ovejas Pelibuey multíparas con registros reproductivos. La metodología de T-ARSM-PCR permitió la identificación de los genotipos silvestre y doble mutado en los polimorfismos *G4* y *G6* del gen *GDF9* y, no se encontraron polimorfismos del gen *BMP15*. Estos resultados fueron confirmados mediante la metodología de la secuenciación. En conclusión, la metodología de T-ARSM-PCR permitió identificar los genotipos mutado y silvestre en los SNP *G4* y *G6* del gen *GDF9* y no se encontraron polimorfismos en el gen



BMP15 en ovejas Pelibuey. Esta técnica resultó ser confiable, de fácil aplicación y rápida en la identificación de genotipos en polimorfismos.

Palabras clave: genes, SNP, T-ARMS-PCR, secuenciación, genotipado.

#### 4.2 ABSTRACT

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are variations that have a wide distribution in the genome and, in genetic studies, SNPs allow identifying allelic variants related to characteristics of economic importance in sheep production. However, the identification of SNPs and their genotypes through sequencing has high costs and uses specialized material and equipment. The objective of this research was to identify the polymorphisms and their genotypes in the *GDF9* and *BMP15* genes through the Mutation Refractory Amplification System, by means of the Polymerase Chain Reaction with Tetra-primers (T-ARSM-PCR) in Pelibuey sheep. DNA extraction and amplification of the BMP15 and GDF9 genes was performed from blood samples contained in Whatman™ FTA™ cards from 60 multiparous Pelibuey sheep with reproductive records. The T-ARSM-PCR methodology allowed the identification of wild and double mutated genotypes in G4 and G6 polymorphisms of the GDF9 gene and, no BMP15 gene polymorphisms were found. These results were confirmed by the sequencing methodology. In conclusion, the T-ARSM-PCR methodology allowed to identify the mutated and wild genotypes in the G4 and G6 SNPs of the *GDF9* gene and no polymorphisms were found in the *BMP15* gene in Pelibuey sheep. This technique proved to be reliable, easy to apply and fast in the identification of genotypes in polymorphisms.

### 4.3 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, muchos estudios han reportado que la tasa ovulatoria y el tamaño de la camada en ovejas están reguladas por genes que afectan la función ovárica; estos son denominados genes de la fecundidad [1, 2]. Entre ellos se encuentra el receptor a la proteína morfogénica ósea (*BMPR-IB*), la proteína morfogénica ósea 15 (*BMP15*) y el factor de crecimiento y diferenciación 9 (*GDF9*), los cuales se expresan en el ovocito del folículo en desarrollo [3, 4] y son reguladores intraováricos de la foliculogénesis [5]. Los genes *BMP15*, *BMPR-IB* y *GDF9* pertenecen a la gran familia del factor de crecimiento transformante tipo  $\beta$  (TGF $\beta$ ) y generalmente en sus mutaciones o SNP, las ovejas con una copia mutada incrementan la tasa ovulatoria y prolificidad, en tanto que las homocigotas presentan infertilidad y fallas primarias en la foliculogénesis [3, 6]. En el gen *BMPR-IB*, la sustitución de adenina por guanina en la posición 746 de la secuencia de nucleótidos condujo a una substitución no sinónima de glutamina por una arginina en la posición 249 de la proteína [7].

En el gen *BMP15*, las mutaciones encontradas en la región codificante del gen son: *FecX'* (Inverdale), *FecX<sup>H</sup>* (Hanna) [8], *FecX<sup>B</sup>* (Belclare), *FecX<sup>G</sup>* (Galway) [3], *FecX<sup>L</sup>* (Lacaune) [9], *FecX<sup>R</sup>* (Roa) [10], *FecX<sup>Gr</sup>* (Grivette), *FecX<sup>O</sup>* (Olkuska) [11] y *FecX<sup>Bar</sup>* (Bárbara tunesina) [12]; en la mayoría de estas mutaciones hubo un incremento promedio de 0.6 crías por oveja con respecto al genotipo silvestre [8, 3, 9, 10]. Por otro lado, en el gen *GDF9* se han reportado 11 mutaciones puntuales en la región codificante, pero no todas afectan la función ovárica; entre las cuales, sólo cinco tienen efecto en tasa ovulatoria y

tamaño de camada: *FecG<sup>H</sup>* (alta fertilidad) [3], *FecG<sup>T</sup>* (Thoka) [6], *FecG<sup>E</sup>* (Embrapa) [13], *FecG<sup>V</sup>* (Vecaria) [14] y *FecG<sup>NWS</sup>* en la oveja blanca noruega [15].

El polimorfismo es la principal fuente de variación en el DNA de un organismo y puede ser utilizado como marcador molecular para identificar variantes alélicas asociadas a características de importancia económica [16]. En el reconocimiento de estas variantes alélicas, se han utilizado algunas metodologías para identificar SNP y sus genotipos en ovejas; entre estas metodologías, se tienen: la secuenciación de DNA, polimorfismo de longitud de fragmento de restricción mediante la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR-RFLP), polimorfismo de conformación de hebra única (SSCP), hibridación con sondas de fluorescencia TaqMan, Microarreglos de DNA, entre otras [5, 16]. El inconveniente de estas metodologías es el costo elevado de los reactivos; además, se requiere material y equipo especializado para el procesamiento de las muestras [5]. No obstante, Newton *et al.* (1989) [17] desarrollaron el sistema refractario de amplificación de mutaciones (ARSM-PCR) que junto con los tetra iniciadores [18] resultó ser una metodología económica, confiable y de fácil utilización para identificar polimorfismos con sus genotipos [19, 5].

La metodología de T-ARMS-PCR incluye el fundamento del sistema de amplificación refractaria de mutaciones desarrollada por Newton *et al.* (1989) [17] y los tetra iniciadores [18]. En la metodología de T-ARMS-PCR, en una sola reacción amplifican el fragmento del gen de interés y cada iniciador interno se combina con un iniciador externo opuesto para amplificar las formas silvestre, mutado y un fragmento testigo en una sola reacción de PCR [19, 5]. Así, el objetivo de esta investigación fue identificar los polimorfismos y

sus genotipos en los genes *GDF9* y *BMP15* a través del Sistema de Amplificación Refractaria de Mutaciones mediante la Reacción en Cadena de Polimerasa con Tetra-iniciadores (T-ARSM-PCR) en ovejas Pelibuey.

#### **4.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

##### 4.4.1 Ubicación y ovejas

Se utilizaron 60 ovejas de la raza Pelibuey, múltiparas, con registros individuales de un mínimo de tres partos consecutivos, de la unidad de producción agropecuaria “El Gargaleote” propiedad de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en el municipio de Tamuín, S.L.P., México (22°00'04" N, 98°39'05" O) y altitud de 30 m (García, 2004).

##### 4.4.2 Recolección y conservación de muestras

Se recolectaron tres mL de sangre por punción de la vena yugular con jeringas estériles, bajo los criterios de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) [20] sobre especificaciones técnicas, para la producción cuidado y uso de animales de laboratorio, en concordancia con las regulaciones para el uso y cuidado de animales de investigación, aprobado por el Consejo General Académico de Colegio de Postgraduados, México [21]. De la sangre recolectada, se colocaron 0.5 mL en una mini tarjeta Whatman™ FTA™ (WB 120055, GE Healthcare® Reino Unido). Dichas tarjetas se secaron a la sombra de acuerdo a las especificaciones del fabricante (GE Healthcare® Reino Unido) hasta su posterior procesamiento. La fase de laboratorio se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular de uso común del Postgrado en

Fitosanidad, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, Texcoco, Estado de México.

#### 4.4.3 Procesamiento de muestras

Para la extracción del DNA, se hicieron cortes de aproximadamente un mm<sup>2</sup> de la mini tarjeta Whatman FTA impregnada con sangre y se depositó en un tubo Eppendorf de 0.2 mL. En seguida, se realizaron tres lavados con 200 µL del reactivo de purificación FTA (GE Healthcare®, Reino Unido) a temperatura ambiente, durante siete min cada uno, después de cada lavado el reactivo de purificación se desechó. A continuación, se realizaron dos lavados con 200 µL del búfer Tris (hidroximetil aminometano) -EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) a temperatura ambiente por siete min, después de cada lavado se desechó el búfer TE.

#### 4.4.4 Polimorfismos y genotipos en los genes BMP15 y GDF9 por T-ARMS-PCR

En la presente investigación, se utilizó la metodología de T-ARMS-PCR descrita por Ye *et al.* (2001) [18] para la detección de polimorfismos y sus genotipos en los genes *BMP15* y *GDF9* en ovejas Pelibuey. Los fragmentos de estos genes se amplificaron mediante la PCR con las secuencias señaladas en el Cuadro 1. La mezcla de reacción para T-ARMS-PCR de los genes se realizó por separado; cada mezcla de reacción se elaboró en un volumen final de 13.75 µL, que contenía 6.25 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2X (Promega® Madison, WI, E.U.A.), 0.625 µL de cada primer (dos Forward y dos Reverse; IDT®, Illinois, E.U.A.) a una concentración de 10 µM y cinco µL de dihidrato de trehalosa al 10 % (Merck® KGaA 64271, Darmstadt, Alemania). Los tubos con el fragmento de la tarjeta procesada y la mezcla de reacción se introdujeron en un termocilador Biometra®.

Las condiciones de amplificación para cada alelo (silvestre y mutado) se programaron por separado. Para el gen *GDF9*: desnaturalización inicial, 93 °C, tres min, más 35 ciclos (desnaturalización, 93 °C, 40 s; alineamiento: Cuadro 7, extensión, 72 °C, 40 s) y, extensión final, 72 °C, cinco min: Gen *BMP15*: desnaturalización inicial, 95 °C, cinco min, más 35 ciclos (desnaturalización, 95 °C, 40 s, alineamiento: Cuadro 7, extensión, 72 °C, 30 s) y, extensión final, 72 °C, por cuatro min. Los amplicones de T-ARMS-PCR de los genes *GDF9* y *BMP15* se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5 %; en búfer de corrida Tris-Borato-EDTA o TBE al 1 % (IBI Scientific, Dubuque, Iowa, E.U.A), a 80 voltios por 80 min para ambos genes. Se utilizó un marcador molecular de 100 a 1000 pb (Promega<sup>®</sup>, Wisconsin, E.U.A.). El gel se tiñó con Gel Red<sup>®</sup> (Biotium, Hayward, California, E.U.A., un  $\mu\text{L}$  diluido en 99  $\mu\text{L}$  de TBE 1X y se tomaron seis  $\mu\text{L}$ ) que se añadieron al gel de agarosa. Y en cada pozo se depositaron tres  $\mu\text{L}$  del amplicon más tres  $\mu\text{L}$  de Green GoTaq<sup>®</sup> Flexi buffer (Promega<sup>®</sup>, Wisconsin, E.U.A.). El gel se visualizó en un fotodocumentador Quantum<sup>®</sup> con el programa Vision Capt<sup>®</sup>.

Cuadro 7. Secuencias utilizadas para amplificar e identificar los polimorfismos y sus genotipos de los genes *GDF9* y *BMP15* en ovejas Pelibuey mediante la metodología de T-ARSM-PCR.

| Gen          | Mutación                 | Primer | Secuencia 5'→3'                    | Tamaño del producto (pb)            |                                     |
|--------------|--------------------------|--------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>G4</i>    | IF(G)                    | 296    | TTCACATGTCTGTAAATTTTACATGTGAGG     | M= 212, S= 261 T= 417<br>TA= 50 °C  |                                     |
|              | IR(A)                    | 325    | 350 GCTGAAGATGCTGCAGCTGGTCGTT      |                                     |                                     |
|              | OF                       | 118    | 90 CAACAACCTCCATTTCTTTTCCCTTTCCTG  |                                     |                                     |
|              | OR                       | 479    | 506 TAGGCAGATAGCCCTCTC TTCTGGTCAG  |                                     |                                     |
| <i>GDF9</i>  | <i>G6</i>                | IF(A)  | 573 CAGCTCTGAATTGAAGAAGCCTCGGA     | M= 193, S= 223 T= 362<br>TA= 52 °C  |                                     |
|              |                          | IR(G)  | 598                                |                                     | 625 ATTCACTCAGATTGACTGAAGCTGGCAC    |
|              |                          | OF     | 430                                |                                     | 403 TATCTGAACGACACAAGTGCTCAGGCTT    |
|              |                          | OR     | 737                                |                                     | 764 CTGGGACAGTCCCCTTTACAGTATCGAG    |
| <i>G8</i>    | IF(T)                    | 788    | 763 AGGGCGGTCCGACATCGGTATGGATT     | M= 146, S= 108, T= 198<br>TA= 55 °C |                                     |
|              | IR(C)                    | 788    | 817 TGATGTTCTGCACCATGGTGTGAACCGTAG |                                     |                                     |
|              | OF                       | 737    | 710 GGATTGTGGCCCCACACAAATACAACCC   |                                     |                                     |
|              | OR                       | 880    | 907 CATCAGGCTCGATGGCCAAAACACTCAA   |                                     |                                     |
| <i>BMP15</i> | <i>Fec X<sup>G</sup></i> | IF (C) | 391                                | 363 CTTCTTGTTACTGTATTTCAATGACAATC   | M= 112, S= 102, T= 158<br>TA= 48 °C |
|              |                          | IR (T) | 391                                | 417 GAGAGGTTTGGTCTTCTGAACACTATA     |                                     |
|              |                          | OF     | 331                                | 306 AAGAGGTAGTGAGGTTCTTGAGTTCT      |                                     |
|              |                          | OR     | 438                                | 463 AGAGAAGAGAAGGGTCTTTTTCTGTA      |                                     |
| <i>BMP15</i> | <i>Fec X<sup>L</sup></i> | IF (A) | 635                                | 606 TGCTCCCCATCTCTATACCCCAAATA      | M= 204, S= 252, T= 398<br>TA= 52 °C |
|              |                          | IR (G) | 635                                | 662 TGTAGTACCCGAGGACATACTCCCTGAC    |                                     |
|              |                          | OF     | 438                                | 411 ACCTCTCCCTAAAGGCCTGAAAGAGTTT    |                                     |
|              |                          | OR     | 781                                | 808 ACAAGATACTCCCATTTGCCTCAATCAG    |                                     |

La especificidad de nucleótido está indicada entre paréntesis. F = forward, R = Reverse, O = externo (común), I = interno (alelo específico), M = mutante, S = silvestre, T = fragmento testigo y TA = temperatura de alineamiento [19].

#### 4.4.5 Polimorfismos y genotipos en los genes GDF9 y BMP15 por PCR y secuenciación

Para confirmar los SNP y genotipos encontrados en los genes *BMP15* y *GDF9* por la técnica T-ARMS-PCR, se procedió con la amplificación de los genes *GDF9* y *BMP15*, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de punto final, para su posterior secuenciación. La mezcla de reacción se hizo en un volumen final de 12.5  $\mu$ L, con 6.25  $\mu$ L de GoTaq® Colorless Master Mix 2X (Promega® Madison, WI, E.U.A.), 0.625  $\mu$ L de cada primer (*BMP15*, exón 1: For-5'-AATCCTTCTTTGGGGACTGG-3' y Rev-5'-AGCCCTAAAGGGAAGCAAAT-3', y exón 2: For-5'-CCAGAAAAGCCCAACCAATC-3' y Rev-5'-AGTGTAGTACCCGAGGACAT-3', AH009593.2, Galloway *et al.* 2000; *GDF9*, exón 2: For-5'-GGAGAAAAGGGACAGAAGC-3' y Rev-5'-ACGACAGGTACTTAGT-3', [13]; 10  $\mu$ M; IDT®, Illinois, E.U.A.) y 5  $\mu$ L de dihidrato de trehalosa al 10% (Merck® KGaA 64271, Darmstadt, Alemania). Los tubos con el fragmento de la tarjeta procesada y la mezcla de reacción se colocaron en un termociclador Biometra®. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: *BMP15*, exón 1: desnaturalización inicial, 95 °C, cinco min, más 35 ciclos (desnaturalización, 95 °C, 30 s; alineamiento, 54 °C, 40 s y extensión, 72 °C, 30 s) y extensión final, 72 °C, cinco min; exón 2: desnaturalización inicial, 94 °C, cinco min, más 35 ciclos (desnaturalización, 94 °C, 30 s; alineamiento, 54.8 °C, 40 s y extensión, 72 °C, 30 s) y extensión final, 72 °C, cuatro min; *GDF9*, exón 2: desnaturalización inicial, 93 °C, tres min, más 35 ciclos (desnaturalización, 93 °C, 40 s; alineamiento, 56 °C, 40 s y extensión, 72 °C, 40 s) y extensión final, 72 °C, cinco min. Los amplicones se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en



un buffer de corrida Tris-Borato-EDTA al 1 % (TBE; IBI Scientific, Dubuque, Iowa, E.U.A.), a 80 voltios durante 40 min. Se utilizó un marcador molecular de 250 a 10000 pb (Promega<sup>®</sup>, Wisconsin, E.U.A.). El gel se tiñó con Gel Red<sup>®</sup> (Biotium, Hayward, California, E.U.A., un  $\mu\text{L}$  diluido en 99  $\mu\text{L}$  de TBE 1X y se tomaron seis  $\mu\text{L}$ ) que se añadió al gel de agarosa. Y en cada pozo se depositaron tres  $\mu\text{L}$  del amplicón más tres  $\mu\text{L}$  de Green GoTaq<sup>®</sup> Flexi buffer (Promega<sup>®</sup>, Wisconsin, E.U.A.). El gel se visualizó en un fotodocumentador Quantum<sup>®</sup> con el programa Vision Capt<sup>®</sup>. Finalmente, una vez confirmada la aparición de los genes en gel de agarosa, los amplicones que se obtuvieron de los genes (10  $\mu\text{L}$ ), se enviaron a la empresa MACROGEN<sup>®</sup> (Seúl, Corea del Sur) para su limpieza y secuenciación. Los iniciadores fueron los mismos que se utilizaron en la amplificación de cada gen.

#### 4.4.6 Análisis bioinformático de secuencias

La calidad de las secuencias se analizó con el programa Sequencher<sup>®</sup> versión 5.4.6 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, E.U.A. <http://www.genecodes.com>). De las secuencias de cada gen, se realizó una búsqueda en Nucleotide BLAST del NCBI (por sus siglas en inglés, Centro Nacional para la Información Biotecnológica) y se seleccionaron aquellas que tenían mayor similitud con las de nuestro estudio; para el gen *BMP15* fueron AH009593.2 y KT238844.1, mientras que para *GDF9* fueron AF078545.2 y HE866499.1. De las secuencias de cada exón junto con las secuencias de referencia, se realizó un alineamiento para determinar el grado de similitud y detectar polimorfismos con sus genotipos, con el algoritmo MUSCLE<sup>®</sup> [22] en MEGA 7<sup>®</sup> (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, [23]) .

## 4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.5.1 Polimorfismos y genotipos en los genes *GDF9* y *BMP15* por T-ARMS-PCR

En este estudio, la metodología T-AMRS-PCR permitió identificar dos mutaciones puntuales conocidas en el exón 2 del gen *GDF9*, ya que se amplificaron fragmentos de 261 pb (en tres de 60 ovejas) y 212 pb (en 57 de 60 ovejas), respectivamente para el polimorfismo *G4* y fragmentos de 223 pb (en 30 de 60 ovejas) y 193 pb (en 30 de 60 ovejas) para *G6*, respectivamente (Figura 7). Además, no se encontraron ovejas con el genotipo heterocigoto en estas dos variantes. Por otro lado, en el gen *BMP15* sólo se detectaron las formas silvestres de los polimorfismos *FecX<sup>G</sup>* y *FecX<sup>L</sup>* al amplificar fragmentos de 102 y 252 pb, respectivamente (Figura 7). El polimorfismo *G8* no se encontró en este estudio.

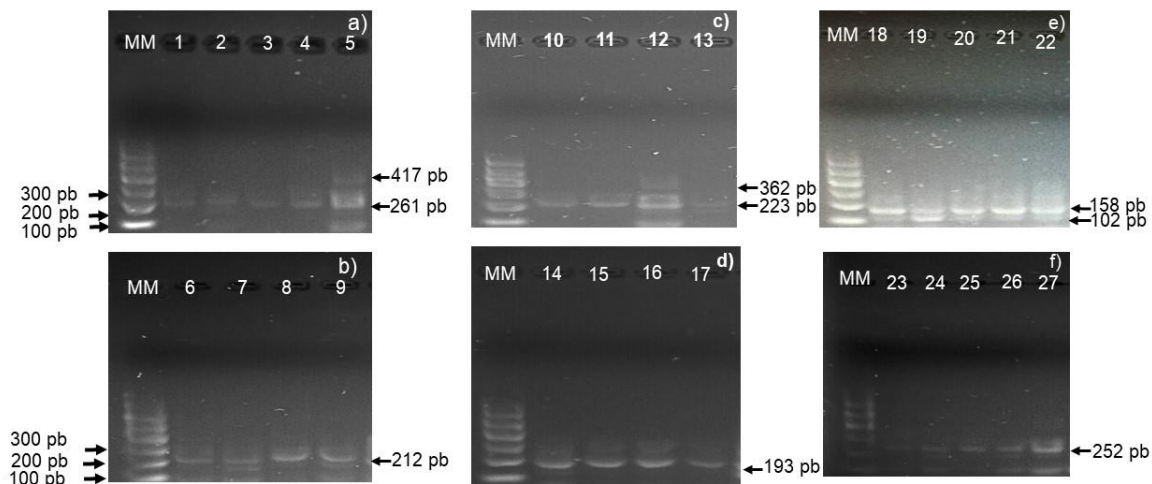


Figura 7. Polimorfismos y genotipos en los genes *GDF9* y *BMP15* por T-ARSM-PCR en ovejas Pelibuey. (MM= marcador molecular). Polimorfismo *G4* con sus genotipos; a) silvestre (carriles 1 a 5: ovejas con fragmento de 261 pb y testigo 417 pb) y b) mutado (carriles 6 a 9: ovejas con fragmento de 212 pb). Polimorfismo *G6* con sus genotipos c) silvestre (carriles 10 a 13: ovejas con fragmento de 223 pb y testigo 362 pb) y d) mutado (carriles 14 a 17: ovejas con fragmento de 193 pb). Polimorfismo *FecX<sup>G</sup>* en su forma e) silvestre (carriles 18 a 22: ovejas con fragmento

de 102 pb, testigo 158 pb) y *FecX<sup>L</sup>* en su forma f) silvestre (carriles 23 a 27: ovejas con fragmento de 252 pb).

#### 4.5.2 Polimorfismos y genotipos en los genes *GDF9* y *BMP15* por secuenciación

Las secuencias de este estudio tuvieron una similitud de 99.32 - 99.77 % para *BMP15* y 99.67 - 99.45 % para *GDF9* con las secuencias AH009593.2, KT238844.1 para *BMP15* y AF078545.2, HE866499.1 para *GDF9*, respectivamente. El alineamiento de las secuencias del gen *BMP15* de este estudio con las de referencia (AH009593.2, KT238844.1) no presentó ningún cambio o mutaciones. En el gen *GDF9*, las secuencias alineadas de este estudio con las de referencia (AF078545.2, HE866499.1) permitieron identificar los SNP *G4* y *G6* en el exón 2 del gen *GDF9*. En el polimorfismo *G4* la guanina es sustituida por adenina en la posición 721 (721 G→A), mientras que en *G6* la guanina es reemplazada por adenina en la posición 994 (994 G→A) (Figura 8). Así mismo, con este análisis se obtuvieron los genotipos en las ovejas Pelibuey. Es importante mencionar que no se encontraron ovejas con el genotipo heterocigoto en los polimorfismos *G4* y *G6* (Figura 8). Así mismo, no se encontró la mutación *G8* con esta metodología.

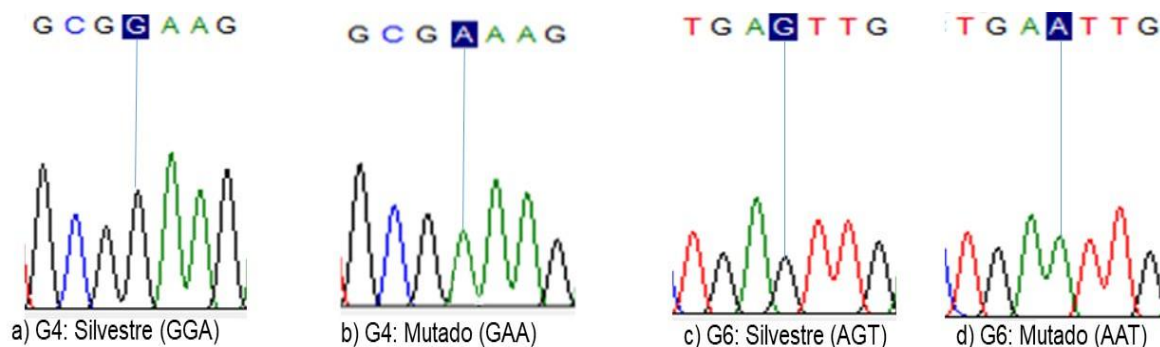


Figura 8. Electroferogramas de los SNP *G4* y *G6* obtenidos por secuenciación del exón 2 del gen *GDF9* en ovejas Pelibuey. El polimorfismo *G4* con sus genotipos a) silvestre y b) mutado y *G6* con sus genotipos c) silvestre y d) mutado. En el gen *BMP15* no se encontraron SNP.

En el polimorfismo *G4*, se detectaron los alelos mutante y silvestre con frecuencias alélicas de 0.05 y 0.95; así mismo, en *G6* se detectaron los alelos silvestre y mutante con frecuencias alélicas de 0.5 y 0.5, respectivamente.

El SNP es un cambio o mutación de una base nitrogenada en la secuencia de DNA y se pueden utilizar como marcador molecular [5]. En la actualidad, el SNP se utiliza para identificar variantes alélicas y genotiparlas [5, 16]. En este estudio, el T-ARMS-PCR permitió identificar el polimorfismo *G4*; y en la genotipificación de este SNP, el 5 % de las ovejas presentó el genotipo mutante y 95 % el genotipo silvestre. Así mismo, se encontró el polimorfismo *G6*; en la genotipificación de este SNP se encontró que el 50 % de las ovejas tenía el genotipo silvestre y el otro 50 % el genotipo mutado o portador. Los resultados obtenidos mediante la metodología de T-ARSM-PCR en este estudio coinciden con los resultados reportados por Polley *et al.* (2010) [19], Roy *et al.* (2011) [24] y Dash *et al.* (2017) [25]. Nuestros resultados sugieren que la oveja Pelibuey es polimórfica en las mutaciones puntuales *G4* y *G6* del gen *GDF9*. Es importante mencionar que, el polimorfismo *G8* no se encontró en las ovejas de este estudio, la ausencia de esta variante alélica posiblemente se debió a que no estuvo presente en las ovejas de este estudio. Por otro lado, en el gen *BMP15* de las ovejas Pelibuey no se encontraron polimorfismos mediante la metodología T-ARSM-PCR, sólo amplificaron las variantes silvestres de los SNP *FecX<sup>G</sup>* y *FecX<sup>L</sup>*. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Polley *et al.* (2010) [19] en ovejas Garole, y Roy *et al.* (2011) [24] en ovejas Bonpala. Sin embargo, difieren de lo encontrado por Argüello-Hernández *et al.* (2014) [26] quienes trabajaron con la misma metodología en ovejas Pelibuey. La falta de mutaciones en el gen *BMP15* en las ovejas de este estudio, quizá se debió a que este

gen es monomórfico y probablemente, el alelo silvestre es el que predomina en estas ovejas [27].

Los análisis de secuencias de los genes *GDF9* y *BMP15* tuvieron un porcentaje de similitud promedio de 99.5 % con las secuencias ovinas reportadas en el GenBank del NCBI, lo cual señala que, las secuencias aquí obtenidas son similares a otros ovinos. En la comparación de las secuencias del exón 2 del gen *GDF9* obtenidas en este estudio con las de referencia (accesión AF078545.2 y HE866499.1) se encontraron los polimorfismos *G4* y *G6*. En el genotipado de estos SNP, sólo se encontraron las formas silvestre y doble mutada (homocigota) en cada variante. En este estudio, los polimorfismos *G4* y *G6* encontrados mediante secuenciación coinciden con los polimorfismos reportados en ovejas Belclare, Cambridge y Mehraban [3, 28]. Referente al gen *BMP15*, no se encontraron mutaciones en las dos regiones codificantes de este gen (exones 1 y 2), de acuerdo al análisis de secuencias de este estudio con las de referencia (accesión AH009593.2 y KT238844.1).

Es importante mencionar que tanto en la metodología de T-ARMS-PCR y secuenciación, no se encontraron ovejas con el genotipo heterocigoto en el gen *GDF9*. La ausencia de heterosis en los polimorfismos *G4* y *G6* en ovejas Pelibuey pudiera ser debida al efecto Wahlund, el cual se refiere a que hay una estructura subpoblacional o mezcla de poblaciones, además de una posible endogamia [29]. Los resultados obtenidos por la metodología de T-ARSM-PCR en la búsqueda de polimorfismos y su genotipado se confirmaron y validaron con los resultados de la secuenciación de las muestras de DNA de las mismas ovejas Pelibuey. Los resultados obtenidos por T-ARSM-PCR no mostraron diferencia con los resultados obtenidos por secuenciación de los genes

*BMP15* y *GDF9*. Finalmente, el T-ARMS-PCR, es una metodología simple, rápida y fácil que se utilizó en la búsqueda de SNP y genotipos en las ovejas, de acuerdo a Polley *et al.* (2010) [19] y Niciura *et al.* (2018) [16]. Tanto la metodología T-ARMS-PCR como la secuenciación identificaron SNP y agruparon exitosamente las ovejas Pelibuey de acuerdo a su genotipo.

#### 4.6 CONCLUSIÓN

En la metodología T-ARMS-PCR se identificaron los polimorfismos *G4*, *G6* y sus genotipos mutado y silvestre en el gen *GDF9*; sin embargo, no se encontraron ovejas con el genotipo heterocigoto. En el gen *BMP15* no se encontraron polimorfismos.

#### 4.7 LITERATURA CITADA

1. Davis GH. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet Sel Evol.* 2005;37 Suppl 1:S11–23.
2. Fabre S, Pierre A, Mulsant P, Bodin L, Di Pasquale E, Persani L, et al. Regulation of ovulation rate in mammals: Contribution of sheep genetic models. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4:1–12.
3. Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, et al. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors *GDF9* and *BMP15* are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod.* 2004;70(4):900–9.
4. Strauss JF, Williams CJ. Ovarian Life Cycle. In: Gargiulo JSRBA, editor. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management: Eighth Edition* [Internet]. Eighth Edi. Elsevier Inc.; 2019. p. 167-205.e9. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00008-1>
5. Ahlawat S, Sharma R, Maitra A, Roy M, Tantia MS. Designing, optimization and validation of tetra-primer ARMS PCR protocol for genotyping mutations in caprine *Fec* genes. *Meta Gene* [Internet]. 2014;2:439–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mgene.2014.05.004>

6. Nicol L, Bishop CS, Pong-Wong R, Bendixen C, Holm L-E, Rhind MS, et al. specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *Reproduction*. 2009;138(6):921–33.
7. Wilson T, Wu X, Juengel LJ, Ross KI, Lumsden MJ, Lord AE, et al. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor ( ALK-6 ) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol Reprod*. 2001;64(4):1225–35.
8. Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MPE, Juengel JL, Jokiranta TS, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet*. 2000;25(3):279–83.
9. Bodin L, Di Pasquale E, Fabre S, Bontoux M, Monget P, Persani L, et al. A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. *Endocrinology*. 2007;148(1):393–400.
10. Martinez-Royo A, Jurado JJ, Smulders JP, Martí JI, Alabart JL, Roche A, et al. A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. *Anim Genet*. 2008;39(3):294–7.
11. Demars J, Fabre S, Sarry J, Rossetti R, Gilbert H, Persani L, et al. Genome-wide association studies identify two novel BMP15 mutations responsible for an atypical hyperprolificacy phenotype in sheep. *PLoS Genet*. 2013;9(4):e1003482.
12. Lassoued N, Benkhilil Z, Woloszyn F, Rejeb A, Aouina M, Rekik M, et al. FecXBar a novel BMP15 mutation responsible for prolificacy and female sterility in Tunisian Barbarine sheep. *BMC Genet*. 2017;18(1):1–10.
13. Silva BDM, Castro EA, Souza CJH, Paiva SR, Sartori R, Franco MM, et al. A new polymorphism in the growth and differentiation factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Anim Genet*. 2010;42:89–92.
14. Souza CJH, McNeilly AS, Benavides M V., Melo EO, Moraes JCF. Mutation in the protease cleavage site of GDF9 increases ovulation rate and litter size in heterozygous ewes and causes infertility in homozygous ewes. *Anim Genet*. 2014;45(5):732–9.
15. Våge ID, Husdal M, Kent PM, Klemetsdal G, Boman AI. A missense mutation in growth differentiation factor 9 ( GDF9 ) is strongly associated with litter size in sheep. *BMC Genet* [Internet]. 2013;14(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-1>
16. Niciura SCM, Cruvinel GG, Moraes C V, Bressani FA, Malagó JW, Benavides M V, et al. PCR-based genotyping of SNP markers in sheep. *Mol Biol Rep* [Internet].

2018;45(4):651–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-018-4206-8>

17. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989;17(7):2503–16.
18. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day INM. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(17):e88.
19. Polley S, De S, Brahma B, Mukherjee A, P.V. V, Batabyal S, et al. Polymorphism of BMPR1B, BMP15 and GDF9 fecundity genes in prolific Garole sheep. *Trop Anim Health Prod.* 2010;42(5):985–93.
20. SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca, y Alimentación,) . Norma oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. D Of la Fed [Internet]. 2001;22 Agosto:107–65. Available from: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999\\_220801.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf)
21. Colpos. Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la investigación en el Colegio de Postgraduados. In: Reglamento para el uso y cuidado de animales en experimentación. 2016. p. 1–16.
22. Edgar RC. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(5):1792–7.
23. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2016;33(1):1870–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27004904>
24. Roy J, Polley S, De S, Mukherjee A, Batabyal S, Pan S, et al. Polymorphism of fecundity genes (FecB, FecX, and FecG) in the Indian Bonpala sheep. *Anim Biotechnol.* 2011;22(3):151–62.
25. Dash S, Maity A, Bisoi PC, Palai TK, Polley S, Mukherjee A, et al. Coexistence of polymorphism in fecundity genes BMPR 1B and GDF9 of Indian Kendrapada sheep. *Explor Anim Med Res* [Internet]. 2017;7(1):33–8. Available from: [http://www.animalmedicalresearch.org/ ...](http://www.animalmedicalresearch.org/)
26. Argüello-Hernández HJ, Cortez-Romero C, Rojas-Martínez RI, Segura-León OL, Herrera-Haro JG, Salazar-Ortiz J, et al. Polimorfismos de la proteína 15 morfogénica ósea (BMP15) y su relación con el tipo de parto en la oveja Pelibuey. *Agrociencia* [Internet]. 2014;48(1):53–69. Available from: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952014000100004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952014000100004)



27. Salazar-Montes A, Sandoval-Rodriguez A, Armendariz-Borunda J. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. Primera ed. McGraw-Hill Interamericana Editores SA de C V, editor. México; 2013. 338 p.
28. Ahmadi A, Afraz F, Talebi R, Farahavar A, Vahidi SMF. Investigation of GDF9 and BMP15 Polymorphisms in Mehraban Sheep to Find the Missenses as Impact on Protein. Iran J Appl Anim Sci [Internet]. 2016;6(4):863–72. Available from: [http://ijas.iaurasht.ac.ir/article\\_526632.html](http://ijas.iaurasht.ac.ir/article_526632.html)
29. Kumar D, Sharma R, Pandey KA, Gour SD, Malik G, Ahlawat SPS, et al. Genetic diversity and bottleneck analysis of Indian bellary sheep by microsatellite markers. Russ J Genet. 2007;43(9):996–1005.

## CONCLUSIONES GENERALES

- Se amplificaron los genes *BMP15* y *GDF9*
- En el gen *BMP15* no se encontraron polimorfismos
- En el gen *GDF9* se encontraron los polimorfismos *G2*, *G3*, *G4*, *G5*, *G6* y *FecG<sup>E</sup>*
- Las ovejas con el genotipo doble mutado del polimorfismo *FecG<sup>E</sup>* encontrado en ovejas Pelibuey tuvieron mayor tasa ovulatoria y prolificidad
- La metodología de T-ARSM-PCR permitió identificar los polimorfismos *G4* y *G6* del gen *GDF9*.
- La metodología de T-ARSM-PCR es una técnica fácil, confiable y rápida en que se puede utilizar en el genotipado de ovejas.
- Las variantes genéticas o mutaciones encontradas en el gen *GDF9* pueden ser utilizadas en la selección asistida por genes para implementar programas masivos de reproducción y de mejoramiento genético, con la finalidad de mejorar la eficiencia reproductiva y rentabilidad del rebaño de forma natural.