



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GANADERÍA**

## **FACTOR 9 DE CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN ASOCIADO AL ÍNDICE DE PROLIFICIDAD EN LA OVEJA PELIBUEY**

**ELIZABETH PÉREZ RUIZ**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

**2012**

La presente tesis, titulada **Factor 9 de crecimiento y diferenciación asociado al índice de prolificidad en la oveja Pelibuey**, realizada por la alumna: **Elizabeth Pérez Ruiz**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

RECURSOS GENETICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. JUAN SALAZAR ORTIZ

ASESOR



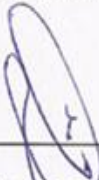
DR. CESAR CORTEZ ROMERO

ASESOR



DR. JAIME GALLEGOS SANCHEZ

ASESOR



DRA. OBDULIA SEGURA LEÓN

ASESOR



DR. CLEMENTE LEMUS FLORES

Montecillo, Texcoco, México, diciembre de 2012.

# FACTOR 9 DE CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN ASOCIADO AL ÍNDICE DE PROLIFICIDAD EN LA OVEJA PELIBUEY

Elizabeth Pérez Ruiz, MC.

Colegio de Postgraduados, 2012

## RESUMEN

El Factor 9 de Crecimiento y Diferenciación (*GDF9*) es miembro de la súperfamilia  $\beta$  de factores de crecimiento ( $TGF\beta$ ) y su expresión en el ovocito es esencial para el desarrollo y crecimiento folicular. Diferentes mutaciones en el gen *GDF9* han sido asociadas con el incremento de tasa de ovulación y/o prolificidad en algunas razas de ovejas, por lo que el objetivo de este estudio fue la búsqueda de polimorfismos de una sola base (SNPs) en el gen *GDF9*, así como la asociación entre polimorfismos del gen *GDF9* y el índice de prolificidad en ovejas de la raza Pelibuey. Se tomaron muestras sanguíneas de la vena yugular de 16 ovejas y fueron conservadas en papel FTA® (Whatman Mini Card). El exón dos del gen fue amplificado mediante la técnica de Polimerase Chain Reaction (PCR) directo ((Phusion® Blood Direct PCR kit) y secuenciado para la búsqueda de SNPs. Se encontraron seis polimorfismos, de los cuales solo la variante *FecG<sup>E</sup>* encontrada en ovejas Pelibuey ha sido asociada anteriormente a la tasa de ovulación y prolificidad en la raza de ovejas Santa Inés. Con el modelo estadístico de regresión bayesiana utilizado para el análisis de prolificidad no se encontró efecto del genotipo para la mutación *FecG<sup>E</sup>*, pero existe una tendencia en ovejas homocigotas para esta variante, a parir un mayor número de corderos.

Palabras clave: análisis de secuencias, *GDF9*, mutación, polimorfismo, PCR, SNP.

# GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR 9 ASSOCIATED WITH PROLIFICACY INDEX IN PELIBUEY SHEEP

Elizabeth Pérez Ruiz, MC.

Colegio de Postgraduados, 2012

## SUMMARY

The Growth Differentiation Factor 9 (*GDF9*) is a member of the Transforming Growth Factor  $\beta$  Superfamily (*TGF $\beta$* ) and its expression in the oocyte is essential for follicle growth and development. Different mutations in *GDF9* have been associated with increase in ovulation rate and / or prolificacy in some breeds of sheep, so the aim of this study was to search single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *GDF9* gene and to investigate the association between SNPs in *GDF9* gene and prolificacy index in Pelibuey sheep. Venous jugular blood samples from 16 Pelibuey sheep were collected on FTA® paper (Whatman Mini Card). Exon two of gen was amplified by direct Polimerase Chain Reaction (PCR) (Phusion® Blood Direct PCR kit) and secuencing for SNPs. Six SNPs were found, but only FecG<sup>E</sup> variant found in Pelibuey sheep has been associated with ovulation rate and litter size in Santa Ines sheep. Bayesian regression model used for analysis of prolificacy found not effect of genotype, but there is a tendency towards an increased number of offspring in homozygous sheep for this variant.

Key words: sequence analysis, GDF9, mutation, polymorphism, PCR, SNP.

## DEDICATORIA

A todos mis seres queridos  
Mis padres, hermanos y amigos.

*“El mundo necesita más seres felices...el objetivo del conocimiento es hacer trascender al ser, más allá de la antinomia de la felicidad y el sufrimiento...todos buscamos la felicidad, pero no nos ponemos a pensar que la felicidad es un estado de desequilibrio y por lo tanto es insostenible. Lo que nos hace trascender a la felicidad es el entendimiento de los motivos de la infelicidad y la felicidad, es decir: el conocimiento”*

Caytacoatl.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento a mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados por haberme dado la oportunidad de realizar los estudios de maestría y por el financiamiento a través del Fideicomiso N° 167304/2010

A la Línea Prioritaria de Investigación LPI-5 (*Biotecnología microbiana, vegetal y animal*) por haber financiado parte de la investigación.

Al Dr. Juan Salazar Ortiz, por la dirección de la tesis, pero sobre todo por su apoyo y amistad.

A los Doctores Jaime Gallegos, Cesar Cortez, Obdulia Segura y Clemente Lemus, integrantes de consejo particular, por su esfuerzo, apoyo, tiempo, dedicación y valiosas observaciones.

Al Dr. Humberto Vaquera por su valiosa ayuda con el análisis estadístico.

A los ingenieros Pliego y Acevez por las facilidades que me otorgaron para la obtención de muestras.

A mis compañeros de LaROCa, por la ayuda que me brindaron para recopilar los datos que necesitaba, y en especial por su amistad.

Al personal académico y administrativo del programa de ganadería.

A todos los seres maravillosos que forman parte de mi vida.

## CONTENIDO

	Página.
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
2.1 Genes de fecundidad.....	2
2.1.1 Gen <i>Booroola</i> : Receptor 1 de la Proteína Morfogénica Ósea (BMPR-1B).....	2
2.1.2 Mutaciones en la Proteína Morfogénica Ósea (BMP15 o GDF9B).....	3
2.1.3 Mutaciones en el Factor 9 de Crecimiento y Diferenciación (GDF9).....	5
2.2 Fisiología del crecimiento folicular.....	7
2.2.1 Foliculogénesis.....	8
2.2.2 Comunicación intrafolicular.....	9
2.2.3 Súper familia $\beta$ de factores de crecimiento.....	10
2.2.4 Receptores para TGF $\beta$ .....	11
2.2.5 Proteína Morfogénica Ósea 15 (BMP15).....	12
2.2.6 Factor 9 de crecimiento y diferenciación (GDF9).....	13
2.2.7 Función de los genes de fecundidad en la regulación de la TO.....	14
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>17</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
4.1 Características de los animales experimentales.....	19
4.2 Ubicación.....	19
4.3 Colección y conservación de las muestras.....	19
4.4 Preparación de la muestra para PCR (Polimerase Chain Reaction).....	19
4.5 Procedimiento de la PCR.....	20

4.6	Secuenciación.....	21
4.7	Análisis de secuencias.....	21
4.8	Análisis estadístico de prolificidad.....	21
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>23</b>
5.1	Conservación de las muestras.....	23
5.2	Obtención de la muestra de ADN.....	23
5.3	PCR.....	25
5.4	Secuenciación.....	26
5.5	Análisis de secuencias para la búsqueda de polimorfismos.....	27
5.6	Prolificidad.....	32
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>37</b>



## CONTENIDO DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Mutaciones en el gen <i>GDF9</i> reportadas en ovejas Pelibuey.....	30
Cuadro 2	Medias de la distribución marginal posterior e intervalo de densidad posterior, para el índice de prolificidad.....	32
Cuadro 3	Distribución marginal posterior e intervalo de densidad posterior, para el número de crías en tres partos.....	33

## CONTENIDO DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Representación esquemática de dos miembros de la TGF $\beta$ .....	11
Figura 2	Esquema del gen <i>GDF9</i> .....	13
Figura 3	Efectos de las mutaciones Fec en la foliculogénesis y tasa de ovulación en la oveja.....	15
Figura 4	Electroforesis en gel de agarosa 1%. (A) PCR de muestras en tarjetas FTA sin utilizar el protocolo de preparación.....	24
Figura 5	Electroforesis en gel de agarosa 1%. (A) y (B) Visualización de fragmentos amplificados del exón dos del gen <i>GDF9</i> correspondientes a ovejas Pelibuey.....	25
Figura 6	Electroforesis en gel de agarosa 1%. (A) y (B) Visualización de producto de PCR después de ser purificado con ExoSAP-It®.....	26
Figura 7	Edición de secuencias con MEGA 5. Eliminación de las primeras 30 bases de la secuencia para su alineamiento.....	27
Figura 8	Adenogramas de dos productos de PCR independientes, de una misma muestra. Se puede observar la sobreposición de bases.....	28
Figura 9	Genotipos reportados por Chu <i>et al.</i> (2011). La sobreposición de bases en la secuencia reportada.....	28
Figura 10	Genotipos reportados por Nicol <i>et al.</i> (2009). Se observa que el genotipo heterocigoto.....	29
Figura 11	Adenogramas de secuencias del exón dos del gen <i>GDF9</i> . Se observa el polimorfismo correspondiente a la variante FecG <sup>S</sup> .....	31
Figura 12	Adenograma de las secuencias del exón dos del gen <i>GDF9</i> en las que se muestra la variante FecG <sup>E</sup> .....	31
Figura 13	Representación gráfica de las distribuciones de los parámetros $\beta_0$ , $\beta_1$ y $\beta_2$ .....	33

Figura 14 Distribución marginal posterior del número de crías en tres partos para los genotipos E/E, E/+ y +/+..... 34

## I. INTRODUCCIÓN

El primer gen reportado como responsable del incremento de la tasa de ovulación (TO) en la oveja fue el gen *Boorola* (*FecB*) en la raza Merino australiano (Piper y Bindon, 1982). El fenotipo hiperprolífico de las ovejas *Boorola* es debido a la acción de un solo gen autosomal (*FecB*) que influye sobre el número de ovulaciones por ciclo estral (Piper *et al.*, 1985). En 2001 se descubrió que la elevada prolificidad en las ovejas Merino *Boorola* es el resultado de una mutación en el receptor de la proteína morfogénica ósea (BM<sup>PR</sup>-1B) (Mulsant *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001).

Actualmente se conocen varias mutaciones en los genes de la Proteína Morfogénica Ósea 15 (*BMP15*) y el Factor 9 de Crecimiento y Diferenciación (*GDF9*), las cuales tienen efecto sobre la tasa de ovulación y prolificidad en la oveja (Galloway *et al.*, 2000; Hanrahan *et al.*, 2004). Las primeras mutaciones reportadas para la *BMP15* o *GDF9B* asociadas a una elevada prolificidad fueron descritas en ovejas de la raza Romney (*FecX<sup>l</sup>* y *FecX<sup>H</sup>*) (Davis *et al.*, 1992; Galloway *et al.*, 2000). Posteriormente se descubrieron otras mutaciones en ovejas de la raza Lacaune (Bodin *et al.*, 2002; Lecerf *et al.*, 2002), Cambridge y Belclare (Hanrahan *et al.*, 2004) y Aragonesa (Martínez-Royo *et al.*, 2008; Monteagudo *et al.*, 2009). En 2004 fue reportada la mutación *FeCG<sup>H</sup>* en ovejas Cambridge y Belclare (Hanrahan *et al.*, 2004). Recientemente se han reportado otras mutaciones del gen *GDF9* en ovejas Thoka Cheviot (Nicol *et al.*, 2009), Santa Inés (Silva *et al.*, 2010), Small Tail Han (Chu *et al.*, 2011).

Hasta ahora las mutaciones asociadas a incrementos de la tasa de ovulación y prolificidad en los genes *BM<sup>PR</sup>-1B*, *GDF9* y *BMP15* (Hanrahan *et al.*, 2004; Nicol *et al.*, 2009) pertenecen a cambios no sinónimos en proteínas pertenecientes a la súper-familia  $\beta$  de factores de crecimiento producidas por el ovario (Mulsant *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001; Hanrahan *et al.*, 2004). Por lo que el objetivo principal de esta investigación, es determinar polimorfismos en el gen *GDF9* asociados al índice de prolificidad en ovejas Pelibuey.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Genes de fecundidad.

Mutaciones en los genes de Receptor I de la Proteína Morfogénica Ósea (BMPR-1B), Proteína Morfogénica Ósea 15 (BMP15) y Factor 9 de Crecimiento y Diferenciación (GDF9) pueden causar el incremento de la tasa de ovulación y prolificidad o por el contrario presencia de estructuras ováricas anormales e infertilidad, por lo que son conocidos como “genes de fecundidad” (Davis, 2005).

#### 2.1.1 Gen *Booroola*: Receptor 1 de la Proteína Morfogénica Ósea (BMPR-1B).

En la década de 1980 se postuló la existencia de un gen con influencia en la tasa de ovulación y prolificidad en ovejas Merino Booroola (Piper y Bindon, 1982), en esta raza se encontró evidencia de segregación de un gen autosomal con efecto aditivo (Piper *et al.*, 1985). Las ovejas que heredan una copia del gen Booroola de alguno de los padres producen alrededor de 1.5 ovocitos extra y tienen un cordero más por parto. Las portadoras homocigotas producen 3 ovocitos extra que resultan en 1.5 corderos por parto (Davis, 2004). Con el descubrimiento del llamado “gen *Booroola*” se inició un programa de selección en esta raza y la búsqueda de marcadores genéticos como herramienta para la selección genética. Esta mutación fue denominada *FecB* y posteriormente el alelo fue localizado en el cromosoma 6 (Montgomery *et al.*, 1993).

La prolificidad elevada en ovejas Booroola es causada por una mutación puntual o polimorfismo de un nucleótido (SNP) en la posición 830 que produce el cambio de Ácido Glutámico por Arginina en la posición 249 (q249r) de la cadena de aminoácidos (Mulsant *et al.*, 2001), una zona altamente conservada de la región intracelular del dominio quinasa del receptor I B de la proteína morfogénica ósea (BMPR-1B), la cuál es expresada en células de la granulosa. El BMPR-1B también es conocido como ALK-6, es miembro de la súper familia  $\beta$  de factores de crecimiento (Souza *et al.*, 2001). Estas son proteínas multifuncionales que regulan el crecimiento y diferenciación de muchos tipos celulares (Wilson *et al.*, 2001). Los

miembros de esta familia de proteínas tienen un papel esencial en la regulación de la función ovárica (Matzuk *et al.*, 2002).

El aumento en la tasa de ovulación, en ovejas *FecB*, se asocia con la maduración precoz de un gran número de folículos antrales que ovulan teniendo un menor tamaño que los folículos de ovejas no portadoras o fenotipo silvestre (McNatty *et al.*, 1986). Adicionalmente en la dinámica de crecimiento folicular final, en ovejas *FecB*, los folículos preovulatorios alcanzan su tamaño máximo al inicio de la fase folicular y permanecen en una meseta hasta la ovulación (Driancourt *et al.*, 1986). Los folículos ovulatorios de ovejas portadoras de la mutación *FecB* poseen un número reducido de células de la granulosa por folículo. Sin embargo, el número total de células de la granulosa de todos los folículos ovulatorios y la producción de estradiol es similar en ovejas *FecB* heterocigotas, homocigotas y no portadoras (Montgomery *et al.*, 1992).

Dichas diferencias en el desarrollo folicular de ovejas con la mutación *FecB* o *ALK6* están asociadas con una mayor respuesta a FSH, la cual es inducida por la vía AMPc, así como una temprana esteroidogénesis folicular, incluida la actividad aromatasa en las células de la granulosa, la cual esta acompañada de una respuesta temprana a LH (Montgomery *et al.*, 2001). Dichos eventos producen el crecimiento y ovulación de múltiples folículos con diámetro pequeño sin alteraciones en la secreción de esteroides e inhibina (durante las fases folicular y lútea del ciclo estral) en las ovejas con la mutación *ALK6* (Montgomery *et al.*, 2001). Investigaciones posteriores han revelado que en ovejas Garole, Hu, Small Tail Han y javanesas existe la mutación *FecB* (Davis *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2006).

### **2.1.2 Mutaciones en la Proteína Morfogénica Ósea (BMP15 o GDF9B).**

En 1990 se descubrió que la elevada prolificidad en un rebaño de ovejas descendientes de una oveja Romney con un registro de 33 corderos en 11 partos estaba determinada por un patrón hereditario ligado al sexo, concretamente al cromosoma X, esta mutación fue denominada Inverdale o *FecX<sup>l</sup>* (Davis *et al.*,

1992). A mediados de la década de 1990 se encontró otro alelo con un patrón de heredabilidad similar al *FecX<sup>I</sup>* en ovejas de esa misma raza y fue nombrado *FecX<sup>H</sup>* (Hanna) (Davis *et al.*, 2001). Las ovejas heterocigotas para *FecX<sup>I</sup>* y *FecX<sup>H</sup>* presentan un incremento de la tasa de ovulación, pero aquellas con dos copias del alelo son infértiles (Davis *et al.*, 1992) y poseen ovarios subdesarrollados que contienen folículos con no más de una capa de células de la granulosa (Galloway *et al.*, 2000). Una copia del alelo *FecX<sup>I</sup>* incrementa la TO en 0.8 (Davis *et al.*, 1992), mejora la sensibilidad a LH y el número de folículos antrales (Shackell *et al.*, 1993), mientras que una copia del alelo *FecX<sup>H</sup>* causa un incremento de 1.0 en la TO y 0.6 corderos por parto (Davis *et al.*, 1995).

El alelo *FecX<sup>I</sup>* corresponde a una mutación puntual o SNP, en este caso Timina por Adenina (T-A) en la posición 896 de la cadena complementaria de DNA (cDNA) que codifica para el BMP15 o GDF9B. Esta mutación causa una sustitución del aminoácido Valina por Ácido Aspártico en la posición 299 de la proteína sin procesar (aminoácido 31 de la proteína terminada). El alelo *FecX<sup>H</sup>* corresponde a un cambio de Citosina por Timina (C-T) en la posición 871 de la cadena de cDNA. Esta mutación produce un alto prematuro en la síntesis de la proteína (aminoácido 23 de la proteína terminada) produciendo la pérdida de la bioactividad del BMP15 (Galloway *et al.*, 2000).

Hanrahan *et al.* (2004) encontraron mutaciones en el gen *BMP15* en ovejas de las razas Belclare y Cambridge, a las que nombraron Galway (*FecX<sup>G</sup>*) y Belclare (*FecX<sup>B</sup>*). El alelo *FecX<sup>G</sup>* es un cambio de Citocina por Timina en la posición 718 de la secuencia de nucleótidos, el cuál produce un codón de término prematuro en el aminoácido 239 de la proteína sin procesar. Mientras que el alelo *FecX<sup>B</sup>* es una transición de Guanina por Timina (G-T) en el nucleótido número 1100 del cDNA y produce el cambio del aminoácido Serina por Isoleucina en la posición 367 de la preproteína (aminoácido 99 en la proteína terminada). El fenotipo homocigoto de ovejas con estas mutaciones es indistinguible de fenotipo *FecX<sup>I</sup>* y *FecX<sup>H</sup>* (McNatty *et al.*, 2005). En ovejas Belclare heterocigotas el alelo *FecX<sup>B</sup>* aumenta de  $2.38 \pm 0.549$  la TO y en ovejas Cambridge el alelo *FecX<sup>G</sup>* incrementa  $1.18 \pm 0.387$  la TO. El efecto de estas mutaciones para ambas razas, basado en

estimaciones ponderadas es:  $FecX^G$   $0.70 \pm 0.105$  y  $FecX^B$   $0.97 \pm 0.063$  para el incremento de la TO (Hanrahan *et al.*, 2004).

En la oveja Lacaune también se ha reportado la presencia de una mutación en el gen BMP15, el alelo presente en esta raza fue nombrado  $FecX^L$ . Es un cambio de Guanina por Timina (G-T) que produce la sustitución del aminoácido Cisteína por Tirosina en la posición 53 de la proteína. Las ovejas heterocigotas  $FecX^L$  tienen 1.5 ovulaciones más que las no portadoras (Bodin *et al.*, 2006).

En ovejas españolas de la raza Aragonesa, la presencia de delección de 17 pares de bases (pb) reportada en el gen BMP15 denominada  $FecX^R$  da como resultado un desplazamiento de la lectura de aminoácidos, por lo que los siguientes 54 codones son completamente diferentes y produce pérdida total de la funcionalidad de la proteína (Martínez-Royo *et al.*, 2008). Como consecuencia de ello, alrededor de 85% de la secuencia de aminoácidos codificada por el exón dos del gen *BMP15* es modificada o suprimida, solo los primeros 45 de 245 aminoácidos se conservan idénticos. Las ovejas heterocigotas para esta delección presentan una prolificidad elevada (2.66 corderos por parto) comparada con la media de los rebaños de 1.36 corderos (Monteagudo *et al.*, 2009).

### **2.1.3 Mutaciones en el Factor 9 de Crecimiento y Diferenciación (*GDF9*).**

En 2004 se reportaron ocho mutaciones o polimorfismos de una sola base (SNP) del gen *GDF9* (Hanrahan *et al.*, 2004) en ovejas Cambridge y Belclare (G1 a G8), de los cuales uno se localiza en el exón 1, otro en el intrón y seis en el exón 2. Tres SNP no alteran la secuencia de aminoácidos (G2 en la posición 471, G3 en la posición 477 y G5 en la posición 978 de la secuencia de nucleótidos) y cinco de ellos resultan en un cambio en la secuencia de aminoácidos (G1, G4, G6 y G7). G1 es el cambio de una Arginina por una Histidina en el residuo 87 del exón 1. G6 sustituye a Valina por Isoleucina en el aminoácido 14 de la proteína madura y G7 produce el cambio de Valina por Metionina en el aminoácido 53. G4 es el cambio de Ácido Glutámico por Lisina en el residuo 241 de la pre-pro-proteína, estos SNP no afectan la actividad de la proteína madura, sin embargo la variante G8 produce el cambio de Serina por Fenilalanina en el aminoácido 77 de la proteína madura,



que es una región del GDF9 que probablemente participa en la unión al receptor (Hanrahan *et al.*, 2004). El análisis de ausencia o presencia de cada uno de los SNP fue relacionada con la esterilidad de los animales muestreados, como resultado se encontró que solo las ovejas homocigotas para G8, nombrado como *FecG<sup>H</sup>* son infértiles. El efecto de este alelo para las ovejas Belclare heterocigotas en la TO fue de  $1.79 \pm 0.54$ , para las ovejas Cambridge heterocigotas  $2.35 \pm 0.386$  y el efecto para ambas razas fue de  $1.39 \pm 0.107$ .

El SNP en el gen *GDF9* denominado “Thoka o FecTT”, descrito por Nicol *et al.* (2009) fue introducido a ovejas Cheviot en el Reino Unido a partir de ovejas islándicas (Russel *et al.*, 1997). Al realizar la secuenciación de la región codificable del gen *GDF9* a partir de muestras de ovejas con anomalías en el tracto reproductivo, de las cuales se sospechaba eran portadoras de la mutación Thoka (TT), así como de ovejas que no portaban la mutación, se encontró que todas las ovejas infértiles resultaron homocigotas para una sustitución de Adenina por Citocina (A-C) en la posición 1279 de la secuencia nucleotídica que corresponde al aminoácido 427 (preproteína, 109 de la proteína madura) y es una sustitución de Serina por Arginina, la cual afecta la función de la proteína madura. Al analizar una población de 390 ovejas de las que se tenía el registro de prolificidad, se estimó que el SNP encontrado en las ovejas heterocigotas tiene un efecto de  $0.56 \pm 0.06$  en el tamaño de camada comparadas con aquellas ovejas que no son portadoras del SNP (Walling *et al.*, 2002). Al realizar una caracterización de la morfología ovárica de las ovejas homocigotas para el SNP TT. La región cortical de los ovarios de estas ovejas contenían un gran número de folículos primordiales, así como folículos con dos capas de células de la granulosa, muchos de los cuales parecían anormales y sin capas de células de la teca (Nicol *et al.*, 2009).

En la oveja Small Tail Han se descubrió la presencia de un SNP (G729T) asociado a la prolificidad. Este SNP se encuentra situado en el nucleótido 729 y consiste en el cambio de Citocina por Timina (C-T) en la secuencia de nucleótidos, que produce el cambio de Glutamina por Histidina. Las ovejas

heterocigotas para este alelo tuvieron 0.77 más corderos que aquellas sin el SNP (Chu *et al.*, 2011).

En ovejas de la raza Santa Inés se reportó la existencia de otro SNP en el exón dos del gen GDF9 (Silva *et al.*, 2010). Los polimorfismos reportados en ovejas Santa Inés incluyen al G1, G2 y G3 (Hanrahan *et al.*, 2004) sin efecto sobre la tasa de ovulación, y el SNP en la posición 1034 de la secuencia de nucleótidos que produce el cambio de Timina por Guanina (T-G) y en la secuencia de aminoácidos la sustitución de Fenilalanina por Cisteína, fue nombrado *FecG<sup>E</sup>* o *FecG<sup>SI</sup>*.

Para determinar la asociación del alelo *FecG<sup>E</sup>* a la tasa de ovulación y prolificidad se realizó un análisis de 39 ovejas durante los años 2002 a 2008. La TO fue mayor para las ovejas homocigotas (E/E) que mostraron  $2.22 \pm 0.12$  comparadas con los grupos de ovejas heterocigotas. El grupo de ovejas heterocigotas (E/+) no tuvo diferencias significativas ( $P < 0.612$ ) en cuanto al número de cuerpos lúteos o TO que fue de  $1.34 \pm 0.08$  comparado con la TO del genotipo silvestre (+/+) de  $1.22 \pm 0.11$  (Silva *et al.*, 2010). En esta raza de ovejas no se encontraron mutaciones en el gen *BMP15*.

## **2.2 Fisiología del crecimiento folicular.**

Tradicionalmente los estudios referentes al control de desarrollo folicular están enfocados en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Sin embargo durante los últimos años las investigaciones referentes a la acción de algunos factores de regulación intraovárica miembros de la súper familia  $\beta$  de factores de crecimiento ha demostrado que son potentes reguladores de la foliculogénesis (Juengel y McNatty, 2005).

### 2.2.1 Foliculogénesis.

El ovario tiene como funciones la generación de ovocitos competentes para la fertilización y la secreción de hormonas esteroides necesarias para preparar el tracto reproductivo para la fertilización y el establecimiento de la gestación (Knigh y Glister, 2006). Los folículos son las unidades funcionales del ovario y cada folículo consiste en un ovocito rodeado de una o más capas de células somáticas. Poco después de que el ovocito detiene su división en diploteno de la profase I meiótica (estado dictiado) las células de la pregranulosa forman una capa de células escamosas que junto con el ovocito constituyen los folículos primordiales. Una vez iniciado el crecimiento de un folículo existen dos alternativas posibles: que degenera a través del proceso llamado “atresia” o la ovulación (Hsueh *et al.*, 1984). Durante la fase crecimiento folicular que es independiente de gonadotropinas los folículos primordiales en reposo inician su crecimiento, el cual es morfológicamente caracterizado por un incremento en el tamaño del ovocito y la transición de las células de la pregranulosa de tipo escamoso a células de la granulosa de tipo cuboidal, seguida de la secreción de glicoproteínas de la zona pelúcida, dando lugar a los folículos primarios (Eppig, 2001). A través de sucesivas divisiones meióticas se forman varias capas de células de la granulosa en respuesta a señales intrafoliculares (Adashi, 1992), que provocan la transición de folículos primarios a folículos secundarios o preantrales. En este estadio las células de la granulosa adquieren receptores para la hormona folículo estimulante (FSH). Simultáneamente con la proliferación de las células de la granulosa se desarrolla alrededor del folículo otra capa de células originadas del estroma ovárico que forman la teca folicular, la aparición del estrato tecal está asociada a la vascularización del folículo. A medida que se forman los capilares las células de la teca inician su diferenciación con la adquisición de receptores para la Hormona Luteinizante (LH) y adquieren la capacidad de sintetizar esteroides. (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

Dentro de los folículos en crecimiento, entre las células de la granulosa se forman espacios irregulares llenos de líquido que posteriormente confluirán en una sola

cavidad llamada antro o cavidad antral. Esta fase de crecimiento es dependiente de gonadotropinas y la velocidad de crecimiento es muy rápida comparada con las fases anteriores de crecimiento (de 0.8 mm a 2.5 mm) (Scaramuzzi *et al.*, 1993). La formación del antro divide a la población de células de la granulosa en dos grupos: 1) células de cúmulo que mantienen una estrecha relación con el ovocito a través de uniones gap y 2) células de la granulosa mural que revisten la pared folicular. Una o más capas de células del cúmulo permanecen unidas al ovocito después de la ovulación, formando la corona radiada. Durante la transición de los folículos del estadio antral a preovulatorio la FSH estimula en las células de la granulosa la aromatización de los andrógenos (producidos por las células de la teca) a estrógenos y la expresión de receptores de LH.

Los estrógenos producidos por los folículos antrales ejercen un efecto de retroalimentación positiva hacia el hipotálamo e hipófisis para liberar el pico preovulatorio de LH, mientras que la inhibina producida por las células de la granulosa inhibe la secreción de FSH. Los folículos preovulatorios son aquellos que han adquirido la habilidad para ovular en presencia de niveles adecuados de LH, en caso de no coincidir con un pico preovulatorio de LH estos folículos sufren atresia.

El pico preovulatorio de gonadotropinas induce cambios en el ovocito y las células del cúmulo, los ovocitos reanudan la meiosis y progresan a metafase II antes de la ovulación, cuando el ovocito se encuentra maduro las células del cúmulo secretan ácido hialurónico, cuando este es hidratado los espacios entre las células incrementan, este proceso es llamado expansión del cúmulo o mucificación, este un proceso importante para que se lleve a cabo la ovulación (Eppig, 2001).

### **2.2.2 Comunicación intrafolicular.**

Aunque el mecanismo de selección y activación de los folículos primordiales para entrar a la cohorte de folículos en desarrollo es desconocido, el ovocito juega un papel clave para el desarrollo de la fase folicular temprana (Eppig, 2001). Durante la foliculogénesis normal el crecimiento y maduración del ovocito se encuentra coordinado con la proliferación y diferenciación de las células de la teca y

granulosa. Este crecimiento depende de una adecuada programación de señales endocrinas entre las gonadotropinas producidas por la hipófisis, hormonas ováricas y los factores de crecimiento producidos por el ovocito (Knigh y Glistler, 2006).

Dentro del folículo existe comunicación bidireccional entre el ovocito y las células somáticas así como entre las células somáticas, para que el ovocito pueda continuar su desarrollo a la siguiente fase (Eppig, 2001). Estudios recientes respecto a la comunicación intrafolicular demuestran que el ovocito secreta factores de crecimiento para inducir desarrollo en las células de la teca a través de comunicación parácrina (McLaughlin y McIver, 2009). Entre los factores de crecimiento secretados por el ovocito, los miembros de la súper familia  $\beta$  de factores de crecimiento (TGF- $\beta$ ) han sido ampliamente estudiados. El Factor 9 de Crecimiento y Diferenciación (GDF9) y la Proteína Morfogénica Ósea (BMP15) revisten especial atención por su participación en el desarrollo folicular (Bodensteiner *et al.*, 1999). El GDF9 es fundamental para la activación de los folículos primordiales y la regulación de la cantidad de folículos que ovularán en cada ciclo (Juengel y McNatty, 2005).

### **2.2.3 Súper familia $\beta$ de factores de crecimiento.**

La súper familia de factores  $\beta$  de crecimiento (TGF $\beta$ ) agrupa a más de 35 proteínas que comparten motivos estructurales (Chang *et al.*, 2002), pero que funcionalmente es muy diversa (Massague y Wotton, 2000). Los miembros de esta familia son sintetizados como pre-pro-proteínas, los cuales están compuestos por un péptido-señal, una pro-región y una pequeña región biológicamente activa. Entre los integrantes de la TGF $\beta$  se encuentran activina e inhibina, hormona antimulleriana, factores de crecimiento y proteínas morfogénicas óseas. En estas proteínas la pro-región es separada de la región madura por un aminoácido básico del sitio de clivaje, el cual es reconocido por miembros de la familia de pro-proteínas convertasas como furina (Chang *et al.*, 2002).

Durante la separación del péptido señal y la pro-región de la región activa, esta forman homo o heterómeros, a través de puentes de disulfuro; sin embargo, la

formación de estos últimos requiere de la presencia de siete cisteínas para el caso del GDF9 y BMP15 (Laitinen *et al.*, 1998; Figura 1).

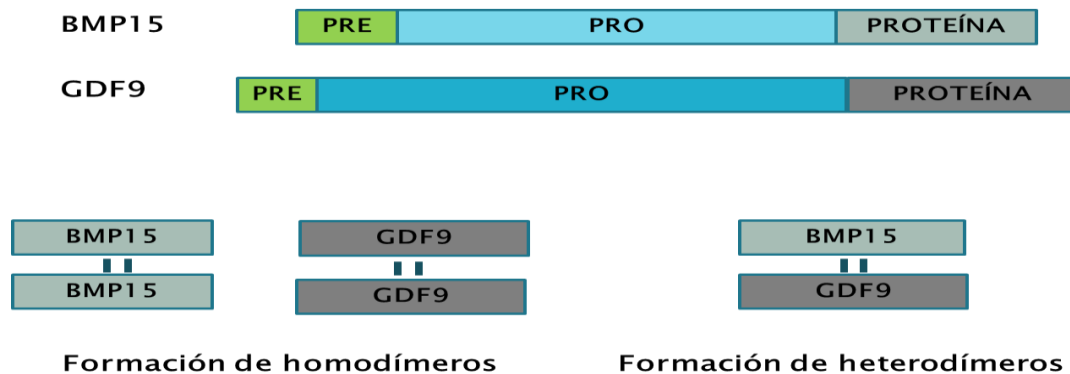


Figura 1. Representación esquemática de dos miembros de la TGF $\beta$  sintetizados como preproteínas y la formación de homo y heterodímeros de las regiones activas de estas proteínas. Modificado de Laitinen *et al.* (1998).

La TGF $\beta$  ha sido clasificada en varias subfamilias. Entre ellos, la subfamilia TGF- $\beta$  (compuesta por TGF $\beta$ -1, TGF $\beta$ -2, TGF $\beta$ -3), la extensa subfamilia de proteínas morfogénicas (BMP) (con al menos veinte miembros), subfamilia de factores de crecimiento y diferenciación (GDF; con nueve miembros), la subfamilia activina/inhibina (que incluye activina A, AB, B, inhibinas A, B), subfamilia de factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) (incluye GDNF, artemin y neurotrofina), así como otros muchos miembros (Massagué, 1998).

#### 2.2.4 Receptores para TGF $\beta$ .

Las proteínas de esta familia (a excepción de la subfamilia GDNF e inhibina) actúan en las células blanco a través de la unión y formación de complejos heterotetrámicos con dos subtipos de receptores con actividad kinasa serina-treonina. Estos receptores están clasificados como receptores tipo I y tipo II (en mamíferos siete de tipo I y cinco de tipo II) (Massague y Wotton, 2000). Dentro de cada complejo la actividad kinasa del receptor tipo 2 fosforila al receptor tipo I, esto conduce a la activación de las proteínas de respuesta conocidas como Smads (R-Smads). Una vez activada por la fosforilación la R-Smad interactúa con la Smad 4

(cSmad), la cual se une a la R-Smad fosforilada, este complejo transloca hacia el núcleo, en donde interactúa con factores específicos de transcripción que regulan la expresión de una gran cantidad de genes (Massagué, 1998; Miyanozo *et al.*, 2005).

La BMP15 utiliza la vía clásica de traducción, se une al receptor tipo II BMPR-2B y a un receptor específico ALK6 (BMPR-1B), lo cual produce la activación de R-smads 1, 5 y 8 (Ten Dijke *et al.*, 2002). El GDF9 usa la vía TGF $\beta$ -activina, uniéndose al receptor tipo II BMPR-2R y a un receptor tipo I específico ALK5 (T $\beta$ RI), que activan a las Smad 2 y 3 (Vitt *et al.*, 2002).

### **2.2.5 Proteína Morfogénica Ósea 15 (BMP15).**

El gen de la Proteína Morfogénica Ósea 15 (*BMP15*) ovina se localiza en el cromosoma X, tiene una longitud de 1179 pb. El gen *BMP15* está formado por dos exones y un intrón, el exón uno codifica para un péptido-señal de 25 aminoácidos, la pro-región de 244 aminoácidos es codificada por ambos exones y la región activa biológicamente de 125 aminoácidos es codificada por el exón dos (Galloway *et al.*, 2000). La BMP15 es altamente homóloga al GDF9 y se expresa en los ovocitos de los folículos primarios en ovejas, humanos y roedores (Dube *et al.*, 1998; Laitinen *et al.*, 1998). La BMP15 también se expresa hipófisis, testículos y otros tejidos, lo que sugiere que su actividad no es exclusiva de los ovarios (Otsuka y Shimasaki, 2002). En el ovario interactúa con el GDF9 coordinando la expresión de los genes implicados en la expansión de las células del cúmulo (Lan *et al.*, 2003). Parece que el mantenimiento del nivel preciso de expresión de BMP15 y GDF9 en los ovocitos es esencial para la adecuada fertilidad y desarrollo folicular en la hembra (Liao *et al.*, 2003). También se ha reportado la presencia de un sistema de regulación entre BMP15/GDF9 producidos por el ovocito y el kit ligando producido por células de la granulosa, para mantener el nivel de expresión apropiado de BMP15 y GDF9, esencial en la foliculogénesis (Otsuka y Shimasaki, 2002).

### 2.2.6 Factor 9 de crecimiento y diferenciación (GDF9).

El GDF9 se expresa en ovario, específicamente en ovocitos, así como en testículo de ratón, rata, bovino y humano, hipófisis de ovino y humano glándulas adrenales de ratón y humano (Fitzpatrick *et al.*, 1998; Pennetier *et al.*, 2004; Faure *et al.*, 2005; Farnworth *et al.*, 2006), pero su función en el tejido no ovárico ha sido poco estudiada. Nicholls *et al.* (2009) sugieren que el GDF9 interfiere en la función de las uniones GAP entre las células de Sertoli y promueve la producción de inhibina B de tejido testicular de roedor *in vitro*.

En la especie ovina el gen *GDF9* se localiza en el cromosoma 5 (Sadighi *et al.*, 2002). Contiene dos exones separados por un intrón. El exón uno tiene 397 pb y el exón dos 968 pb (Bodensteiner *et al.*, 1999; Figura 2). El exón1 codifica para un péptido-sígnal, la pro-región es codificada por segmentos de ambos exones y la región madura biológicamente es codificada por el segundo exón. La secuencia del gen *GDF9* es conservada entre mamíferos y es muy similar a la BMP15 o GDF9B (Vitt *et al.* 2002).

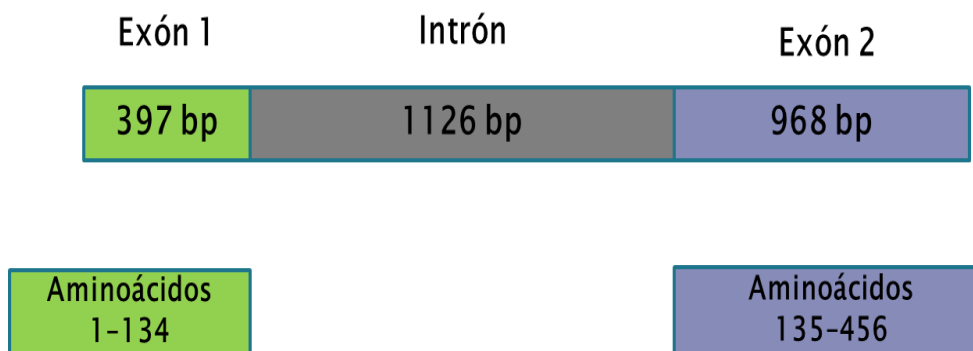


Figura 2. Esquema del gen *GDF9*. El exón 1 del gen es de 397 pares de bases (pb), el intrón tiene 1126 pb y el exón 2 968 pb. El exón 1 codifica para los primeros 134 aminoácidos de la proteína y el exón 2 para los aminoácidos 135 a 456. Modificado de Bodensteiner *et al.* (1999).

El GDF9 es necesario para optimizar el microambiente de los folículos ováricos en crecimiento y participa en el proceso de atresia, ovulación, fertilización y reproducción normal (Orisaka *et al.*, 2009), se encarga de promover la



proliferación de células de la granulosa y es fundamental para la foliculogénesis, en particular durante la transición del folículo primario a folículo preantral (Nicol *et al.*, 2009). El GDF9 en combinación con la BMP15 participa en el proceso de expansión del cúmulo mediante la inducción de algunos genes en las células de la granulosa: hialurono sintasa 2 (*HAS2*), ciclooxigenasa 2 (*COX2*), pentraxina 3 (*PTX3*), prostaglandina dos (*PG<sub>2</sub>*) y gremlina (*GREM1*), que son esenciales para la expansión del cúmulo (Pangas y Matzuk, 2005). La disminución de GDF9 producida por RNA de interferencia (RNAi) mediante inyección en el ovocito de ratones, evita la expansión de las células del cúmulo. Esto corrobora la hipótesis de la función esencial del GDF9 en el proceso de expansión de las células del cúmulo (Gui y Joyce, 2005).

La inmunización contra GDF9 produce un desarrollo folicular anormal, perturbación del ciclo estral y altera la TO en ovinos y bovinos (Juengel *et al.*, 2002; McNatty *et al.*, 2007).

### **2.2.7 Función de los genes de fecundidad en la regulación de la TO.**

Para comprender la función de los genes de fecundidad en la TO, es necesario recordar las consecuencias que tienen las mutaciones de estos genes en la actividad normal de las proteínas para las que codifican.

La mutación en el BMPR-1B o ALK6 produce una pérdida parcial de la función (Fabre *et al.*, 2003), recordemos que este es el receptor específico del BMP15 (que junto con el GDF9 es fundamental para la foliculogénesis). En las mutaciones del gen *BMP15 FecX<sup>H</sup>* y *FecX<sup>G</sup>* y la delección de 17 pb en ovejas de la raza Aragonesa, la presencia anticipada de un codón de término produce la pérdida de la actividad biológica de la proteína madura. Para las mutaciones *FecX<sup>I</sup>*, *FecX<sup>B</sup>* y *FecX<sup>L</sup>* los cambios de aminoácidos también producen la pérdida de la actividad biológica de la BMP15, aunque el mecanismo preciso aún es incierto, es posible que estas mutaciones afecten la formación de homodímeros (Galloway *et al.*, 2000) o heterodímeros con el GDF9 (Liao *et al.*, 2003). Las mutaciones reportadas en el gen *GDF9* también afectan la actividad biológica de

la proteína. La mutación *FecG<sup>H</sup>* en ovejas Belclare y Cambridge está situada en una región de la proteína que está implicada en la unión al receptor de tipo I, por lo que esta mutación podría afectar la capacidad del ligando para unirse al receptor (Hanrahan *et al.*, 2004). Lo anterior apoya la hipótesis de que las mutaciones en los genes *BMPR-1B*, *BMP15* y *GDF9* disminuyen la actividad de este sistema de proteínas morfogénicas (BMP).

Al parecer la disminución de la actividad de las BMP causa el incremento de la TO (Figura 3), basados en este concepto y el papel de estas proteínas durante la foliculogénesis, el mecanismo propuesto para el incremento de la TO debido a la “pérdida de la función del sistema BMP” es explicado por el hecho de que las mutaciones en los genes de fecundidad (*ALK6*, *BMP15* y *GDF9*) perjudican la acción proliferativa de estas proteínas en los primeros pasos del proceso de foliculogénesis, consecuencia de esto es la presencia de folículos con un bajo número de células de la granulosa en ovejas portadoras de alguna mutación en los genes de fecundidad (Fabre *et al.*, 2006).

Además de ello, la presencia de mutaciones en estos genes disminuye la acción inhibitoria de las BMP a la acción de FSH en las células de la granulosa, por lo que la sensibilidad a esta gonadotropina incrementa (Shackell *et al.*, 1993), así como la expresión de enzimas esteroideogénicas, inhibina/activina y receptores de LH en las células de la granulosa de folículos antrales, que funcionan como parámetros de diferenciación. Por consiguiente, estos parámetros de diferenciación en las células de la granulosa aparecen en folículos de menor tamaño en ovejas con mutaciones en los genes de fecundidad (*Fec*) que en aquellas no portadoras (fenotipo silvestre). El aumento de la sensibilidad a gonadotropinas en los folículos de ovejas *Fec* promueve la selección y mantenimiento de un mayor número de folículos durante la fase folicular, cuando las concentraciones de FSH son bajas.

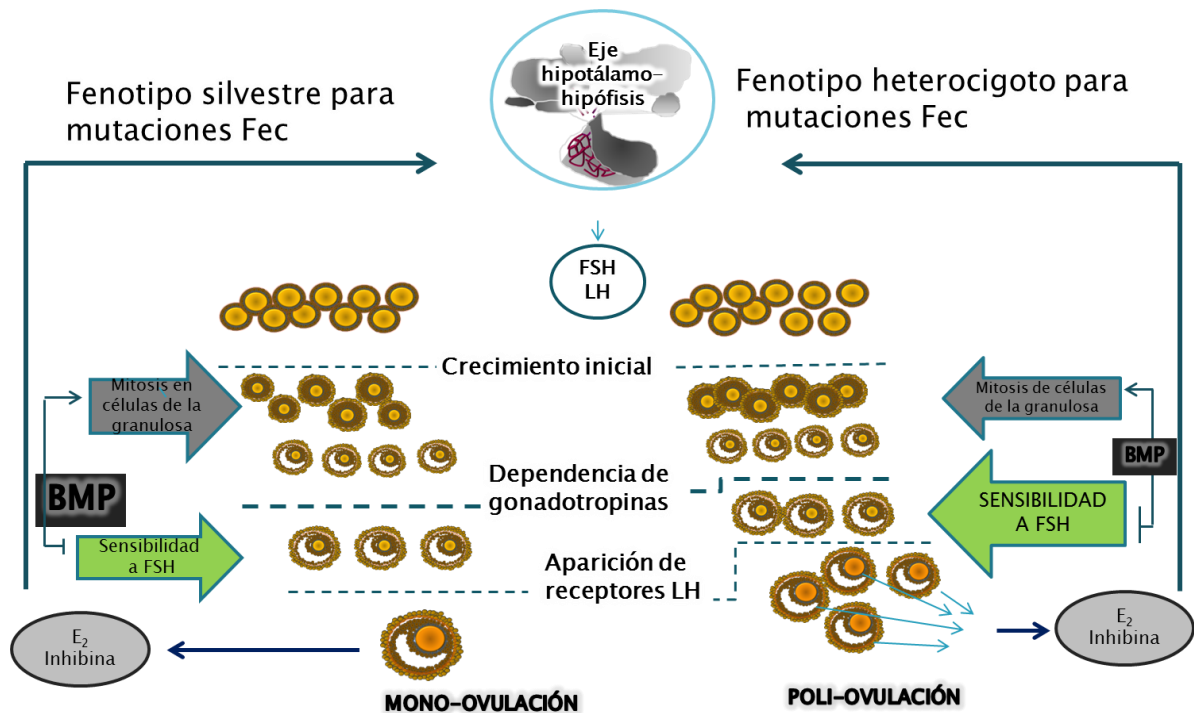


Figura 3. Representación esquemática de los efectos de las mutaciones *Fec* en la foliculogénesis y tasa de ovulación en la oveja. La disminución de la actividad de las BMP en ovejas heterocigotas para mutaciones *Fec*, produce la disminución de la mitosis en células de la granulosa y aumenta la sensibilidad de los folículos a FSH, en comparación con ovejas no portadoras de mutaciones *Fec* (Modificado de Fabre *et al.*, 2006).

En ovejas *Fec*, cada uno de los folículos seleccionados contiene un número reducido de células de la granulosa y produce cantidades bajas de estradiol e inhibina, pero en conjunto esos folículos producen la misma cantidad de estradiol e inhibina que el producido por los pocos folículos en crecimiento de ovejas no portadoras. Puesto que la retroalimentación positiva del estradiol en la secreción de GnRH es provocada usando el mismo umbral en ovejas portadoras de mutaciones y no portadoras, esto hace posible la ovulación y luteinización de numerosos folículos sensibles a LH en ovejas portadoras de mutaciones *Fec* (Fabre *et al.*, 2006).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El mecanismo general de la foliculogénesis en los mamíferos implica un complejo dialogo endocrino entre el sistema nervioso central, el ovario y varios reguladores parácrinos intraováricos (Fabre *et al.*, 2006; Galloway *et al.*, 2000). Sin embargo, los mecanismos que controlan el número de folículos que ovularán cada ciclo estral y por lo tanto, la tasa de ovulación (TO) aun no son claros. En la oveja existe una amplia variación de la TO y prolificidad entre razas y entre individuos de una misma raza (Fabre *et al.*, 2006; Galloway *et al.*, 2000). Dicha variación puede ser regulada genéticamente, por la acción de genes con efecto en la función ovárica como lo indican las investigaciones reportadas en los genes de fecundidad (Davis, 2005).

Las mutaciones puntuales con efecto en la TO han sido identificadas en dos genes de la súper Familia de Factores de Crecimiento y Transformación  $\beta$  (TGF $\beta$ ), llamados Proteína Morfogénica Ósea (BMP-15) y Factor 9 de Crecimiento y Diferenciación (GDF9), así como en un receptor TGF $\beta$  conocido como BMPR-IB o ALK6 (Davis, 2004).

Investigaciones recientes en diferentes razas de ovejas asocian al gen *GDF9* con el incremento de la TO e infertilidad (Hanrahan *et al.*, 2004; Nicol *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010), por lo que el gen *GDF9* es un fuerte candidato responsable del incremento de la TO y prolificidad.

Puesto que no se han encontrado investigaciones referentes a la asociación de mutaciones en los genes de fecundidad en la oveja Pelibuey, una raza importante en el territorio mexicano, que entre algunas de sus características deseables presenta prolificidad variable, además de ser rustica y adaptable a diferentes medios. El objetivo principal de esta investigación es determinar polimorfismos en el gen *GDF9* asociados al índice de prolificidad en ovejas Pelibuey.

Las hipótesis planteadas fueron:

Existen polimorfismos en el exón dos del gen GDF9.

La existencia de polimorfismos en el gen GDF9 está asociada a prolificidad (la composición de bases del gen es diferente entre ovejas prolíficas y no prolíficas).

Por otro lado, las muestras sanguíneas utilizadas para estudios moleculares, comúnmente se colectan en tubos con anticoagulante, requieren un adecuado manejo, para evitar la degradación de las muestras, estas se deben mantener en frío (Smith y Burgoyne, 2004). También es importante la elección adecuada de anticoagulantes (Nicole, *et al.*, 2004), los cuales pueden interferir de manera negativa en algunos procedimientos como lo es la PCR (Beutler *et al.*, 1990). Adicionalmente a ello, la elección del método de extracción de ADN es fundamental en estudios moleculares, debido a que la amplificación mediante PCR está relacionada directamente con la cantidad, pureza e integridad de ADN obtenido (Veloso *et al.*, 2000). Finalmente, es necesario encontrar las cantidades y concentraciones adecuadas de los diferentes componentes de la reacción, para obtener amplificación del fragmento deseado. Por lo que los objetivos particulares planteados para la optimización de la fase de laboratorio fueron:

Utilizar una técnica alternativa para la conservación de las muestras de sangre fresca en tarjetas Whatman Mini Card con FTA, que permite colectar y conservar las muestras de sangre en un diámetro de 1.5 cm, sin la necesidad de refrigeración. De la sangre colocada en el papel FTA se toma un fragmento de 1mm, para realizar la extracción de ADN con un protocolo sencillo, para después utilizarlo en PCR y obtener amplificación de DNA en un periodo de tiempo corto.

Implementar de un protocolo de PCR con el kit comercial Thermo Scientific Phusion<sup>®</sup> Blood Direct PCR Kit (Thermo Scientific Finnzymes ©), que permite la utilización de sangre completa, o muestras conservadas en papel FTA sin previa extracción de DNA.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Características de los animales experimentales.**

Las muestras de sangre se obtuvieron de ovejas de la raza Pelibuey de las cuales se obtuvieron los registros de prolificidad en cada parto. De las ovejas seleccionadas 6 pertenecen al Laboratorio de Reproducción en Ovinos y Caprinos “LaROCa” del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, provenientes del Rancho “El tesoro” en Campeche y 12 pertenecen al rancho “Desarrollo Genético los Monjes” en Puebla. Todas las ovejas seleccionadas son multíparas, y se tiene el registro de prolificidad para cada uno de los partos (por lo menos 3). Las edades de ellas varían de cuatro a siete años.

### **4.2 Ubicación**

La investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biología molecular de uso común del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco Edo. de México.

### **4.3 Colección y conservación de las muestras.**

Las muestras sanguíneas fueron colectadas por punción de la vena yugular con jeringas de insulina (estériles y de uso individual para cada oveja) y colocadas en tarjetas Whatman Mini Card con FTA (FTA Mini Card Whatman®, WB120355). Su conservación se realizó a temperatura ambiente de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (GE Healthcare®).

### **4.4 Preparación de la muestra para PCR (Polimerase Chain Reaction).**

Las muestras conservadas en tarjetas Whatman minicard con FTA fueron tratadas con el protocolo de preparación, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Whatman™ FTA™ for blood DNA ©, 51641). Se colocó 1mm de muestra en un tubo de PCR (Polimerase Chain Reaction) y se lavó tres veces agregando 200µL de reactivo de purificación FTA durante 5 minutos a temperatura ambiente, desechando el reactivo después de cada lavado. Posteriormente se realizaron dos

lavados agregando 200  $\mu\text{L}$  de buffer TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) durante 5 minutos. El buffer se desechó después de cada lavado. La muestra se dejó secar dentro del tubo de PCR a temperatura ambiente antes de ser utilizada.

#### **4.5 Procedimiento de la PCR (Polimerase Chain Reaction).**

La PCR se realizó con Thermo Scientific Phusion<sup>®</sup> Blood Direct PCR Kit (Thermo Scientific Finnzymes ©). La mezcla de reacción para PCR se elaboró en 20  $\mu\text{L}$ , conteniendo: 10  $\mu\text{L}$  de 2x Phusion<sup>®</sup> Blood PCR Buffer, 0.2  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido (Forward y Reverse) a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , 0.4  $\mu\text{L}$  de Phusion<sup>®</sup> Blood II DNA Polimerasa, 1 mm de muestra de DNA (conservada en FTA minicard Whatman y previa preparación con protocolo de limpieza FTA) y 9.2  $\mu\text{L}$  de agua destilada para obtener el volumen final (20  $\mu\text{L}$ ).

Para la amplificación del exón dos del gen GDF9 se utilizaron los oligonucleótidos: Forward 5'-GGAGAAAAGGGACAGAAGC-3' y Reverse 5'-ACGACAGGTACACTTAGT-3', reportados por Silva *et al.* (2010)

Con la utilización del kit de PCR Thermo Scientific Phusion<sup>®</sup> Blood Direct PCR, se modificaron las temperaturas reportadas por Silva *et al.* (2010) para la PCR con los oligonucleótidos utilizados. La programación del termociclador requirió la adición de una temperatura de 98°C para lisis celular (recomendada por el fabricante), y de la modificación de la temperatura de alineamiento de 56°C a 56.5°C. La programación del termociclador Biometra<sup>®</sup> utilizado para la PCR fue la siguiente: Lisis celular: 98°C/ 5 min, 35 ciclos de desnaturalización 93°C/40 s, alineamiento 56.5°C/40s, extensión 72°C/40s y una extensión final de 72°C/5 min.

La amplificación de los fragmentos de DNA fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Con el fin de evitar los efectos adversos de la utilización de bromuro de etidio (Singer *et al.*, 1999), se utilizó Gel Red<sup>®</sup> (Biotium, Hayward, California, USA) como agente intercalante para visualizar las bandas de DNA amplificado y el marcador de peso molecular GeneRuler<sup>™</sup> 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

#### **4.6 Secuenciación.**

El producto de PCR obtenido de todas las muestras fue purificado con el protocolo de ExoSAP-It® para su envío a secuenciación. Para ello se colocó 5 µL de producto de PCR en un tubo, al que se agregó 1 µL de ExoSAP-It®, la mezcla fue incubada a 37°C/15 min. y 80°C/15 min.

La secuenciación se realizó por capilaridad en un secuenciador ABI3730X, se realizó por separado para ambas direcciones (Forward y Reverse), por la empresa MACROGEN®.

#### **4.7 Análisis de secuencias.**

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) para la búsqueda de polimorfismos. Inicialmente se realizó un alineamiento (ClustalW 1.6) para determinar la existencia de polimorfismos entre las secuencias obtenidas. Posteriormente se realizó otro alineamiento de las secuencias obtenidas de las ovejas Pelibuey con las secuencias del gen GDF9 ovino reportadas en el banco de genes (número de acceso AF078545 y FJ429111).

#### **4.8 Análisis estadístico de prolificidad.**

El análisis estadístico para la prolificidad de las ovejas de las cuales se obtuvieron las muestras se realizó procedimiento PROC MCMC (SAS, 2011), con el siguiente modelo de regresión bayesiano:

$$Y_i \sim P(\lambda_i)$$

$$\lambda_i = \beta_0 + \beta_1 D_1 + \beta_2 D_2$$

$$\beta_0, \beta_1, \beta_2 \text{ con distribuciones "a priori"} \sim N(0, 1e6)$$

Dónde:

Y<sub>i</sub> = variables de conteo de número de crías.



$D_1, D_2$ = variables indicadoras (“Dummy”) para el factor genotipo.

Se asume que  $Y_i$  sigue una distribución Poisson. El análisis fue realizado utilizando el algoritmo de metrópolis para las Cadenas de Markov Monte Carlo, con 10 000 simulaciones. También bajo el mismo modelo de Poisson bayesiano se obtuvieron las distribuciones posteriores del número de corderos en los tres primeros partos para cada genotipo.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Conservación de las muestras.

Con la utilización de tarjetas Whatman Mini Card con FTA, las cuales son un producto comercial, que consiste en papel filtro impregnado con una mezcla de productos químicos, capaces de lisar las células, prevenir el crecimiento bacteriano y proteger las muestras de ADN, se encontraron ventajas frente a otros métodos tradicionales de conservación de muestras sanguíneas. Las tarjetas ocupan un volumen mínimo, se conservan a temperatura ambiente, es un sistema de conservación de muestras fiable, barato y seguro, puesto que se reducen los requerimientos necesarios para su almacenamiento, a diferencia de los actuales tubos de sangre, como lo mencionan Schifferli *et al.* (2000). Adicionalmente a ello, su uso puede ser ampliamente recomendado en casos particulares en los que es difícil mantener la cadena fría, un ejemplo claro es en investigaciones de fauna silvestre (Smith y Burgoyne, 2004) o en casos en los que las muestras son obtenidas en diferentes países (Davis *et al.*, 2006). La utilización de las tarjetas Whatman Mini Card con FTA posibilita la conservación de muestras durante de por lo menos cuatro años, sin que ocurra degradación del ADN (Smith y Burgoyne, 2004).

La colección y conservación de muestras de sangre para este estudio, en tarjetas Whatman Mini Card con FTA facilitó el manejo de las muestras, al tener pocos requerimientos especiales de almacenamiento y también permitió la adecuada conservación del ADN, lo cual fue demostrado al obtener una buena amplificación, al realizar la PCR y no observarse ADN degradado en los geles de agarosa.

### 5.2 Obtención de la muestra de ADN.

La utilización de las tarjetas Whatman Mini Card con FTA, permitió la obtención de ADN con un protocolo sencillo y rápido. Inicialmente se realizaron pruebas de PCR, con el kit Thermo Scientific Phusion<sup>®</sup> Blood Direct PCR, tomando una muestra directamente de la tarjeta, para su uso en la mezcla de reacción para PCR, pero los resultados de amplificación que se obtuvieron fueron variables.

Debido a ello fue necesario probar el protocolo de preparación de muestras sanguíneas recomendado por el fabricante (Whatman™ FTA™ for blood DNA ©, 51641), con lo cual fue posible obtener amplificación de todas las muestras utilizadas en la PCR (Figura 4).

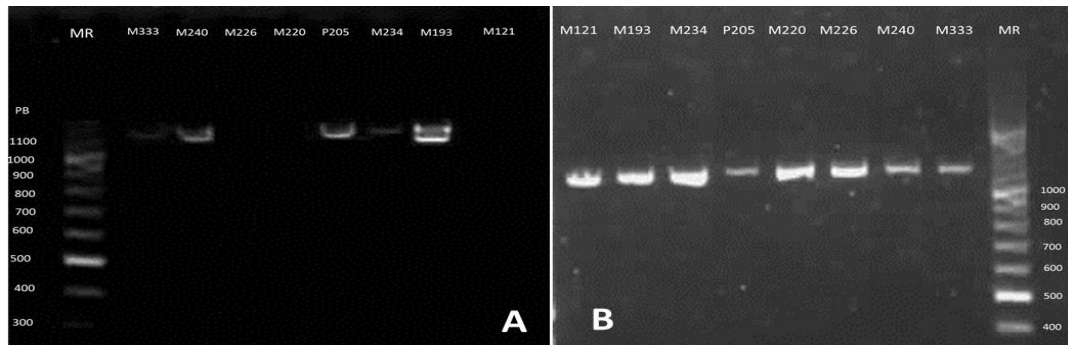


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1%. (A) PCR de muestras en tarjetas FTA sin utilizar el protocolo de preparación. No fue posible obtener amplificación de todas las muestras. (B) PCR con muestras sometidas al protocolo de preparación, con el cual fue posible la amplificación de todas las muestras.

Con la utilización del protocolo de preparación de muestras conservadas en papel FTA, es posible procesar un número considerable de muestras en poco tiempo. La metodología utilizada en este estudio representa ventajas, como sencillez, rapidez y bajo costo, en comparación con los métodos convencionales de extracción de ADN y el uso de kits comerciales (Schifferli *et al.*, 2000). Los métodos convencionales (no comerciales) tienen el inconveniente de requerir prolongados periodos de tiempo, además de que en algunos de ellos se utilizan solventes orgánicos, que pueden ser tóxicos para el ambiente (por ejemplo el método de fenol-cloroformo; Fernandes *et al.*, 2004). El uso de kits comerciales para la extracción de DNA representa un menor riesgo de manipulación de sustancias y menor tiempo para la obtención de ADN, comparado con los protocolos convencionales, pero tienen el inconveniente de ser más costosos y la cantidad de DNA obtenida con ellos es variable (Loffler *et al.*, 1997). Puesto que es fundamental establecer el método más reproducible y eficaz de extracción de ADN antes de proceder a la PCR, la utilización de muestras conservadas en

tarjetas FTA sometidas a un protocolo sencillo de preparación para su uso en la PCR es una opción recomendable.

### 5.3 PCR.

Para determinar la existencia de polimorfismos en el gen *GDF9* se realizó amplificación de ADN, con Thermo Scientific Phusion® Blood Direct PCR Kit (Thermo Scientific Finnzymes©). La optimización de una reacción de PCR radica en el ajuste de las condiciones de amplificación, lo cual incluye adecuadas concentraciones de cada uno de los componentes de la mezcla para PCR (ADN, polimerasa, dNTPs, oligonucleótidos,  $MgCl_2$ ) así como la programación del termociclador (temperaturas y tiempos), con el fin de obtener patrones nítidos y reproducibles de los productos de PCR. Lo anterior representa en algunas ocasiones numerosos intentos para optimizar la amplificación, necesaria para la validación de los resultados obtenidos. La utilización de este kit comercial para PCR hizo posible una adecuada amplificación del fragmento de interés, realizando pocas modificaciones a la programación recomendada en la literatura para los oligonucleótidos utilizados.

Al verificar la amplificación del producto de PCR, mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, se observó la presencia de una banda específica de 1100 pb, correspondiente al exón dos del gen *GDF9* (Figura 5).

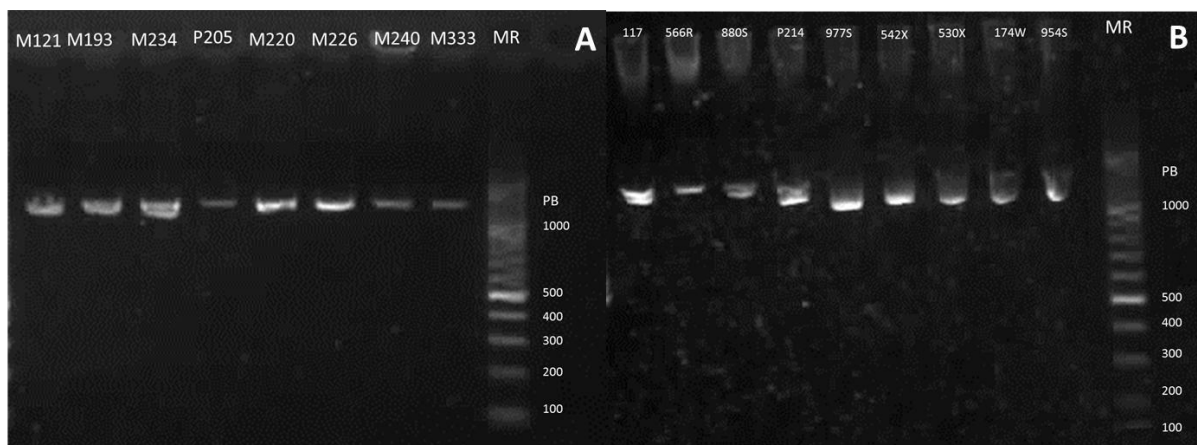


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1%. (A) y (B) Visualización de fragmentos amplificados del exón dos del gen *GDF9* correspondientes a ovejas Pelibuey.

## 5.4 Secuenciación.

Las muestras amplificadas en las que se observó una banda bien definida fueron tratadas con el protocolo de limpieza de Exosap-it. Posteriormente se realizó nuevamente una electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 6) para observar la presencia del fragmento que fue enviado a secuenciar.

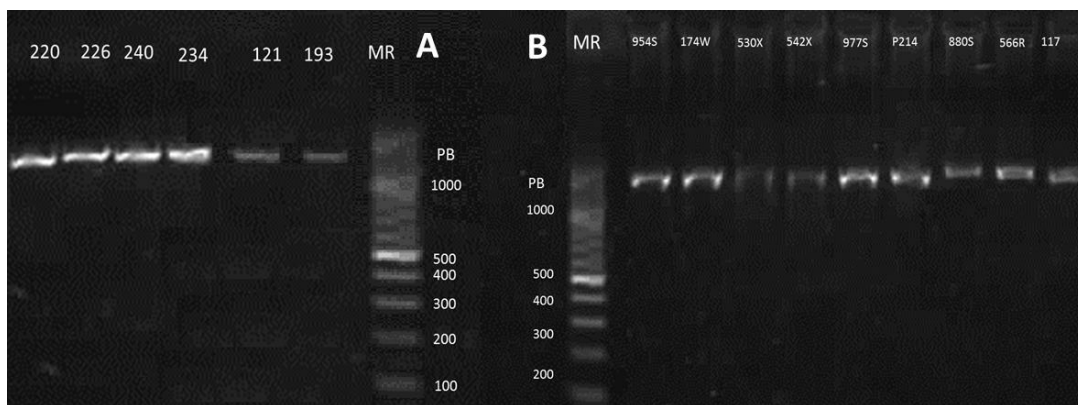


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1%. (A) y (B) Visualización de producto de PCR después de ser purificado con ExoSAP-It® para su envío a secuenciación.

La utilización de protocolos de limpieza de producto de PCR previo a la secuenciación se realiza para eliminar remanentes de los oligonucleótidos y posibles inhibidores de la reacción de secuenciación. Existen diversos protocolos para limpieza de producto de PCR para su envío a secuenciación, entre ellos la utilización de columnas o kits para purificar el producto de PCR (CENTRI-SEP COLUMNS, Invitrogen TM; SPEEDTOOLS PCR CLEAN-UP KIT; BIOTOOLS). El producto EXOSAP-IT®, usado en este estudio, está compuesto por dos enzimas hidrolíticas: exonucleasa y fosfatasa alcalina de camarón, la primera rompe los enlaces fosfodiéster del ADN de una sola hebra y la segunda elimina los grupos fosfato de los dNTPs.

Con el protocolo utilizado se obtuvieron resultados variables, secuencias de buena y mala calidad, por lo que se tomó la decisión enviar producto de PCR sin ser sometido a limpieza. El resultado del producto de PCR sin limpieza fue una

secuenciación buena, aunque se redujo un poco la cantidad de bases con una clara lectura, a pesar de lo cual utilizar producto de PCR sin limpieza produce buenos resultados, por lo que puede ser una opción cuando se tienen malos resultados con muestras sometidas a alguno de los diferentes protocolos de limpieza.

### 5.5 Análisis de secuencias para la búsqueda de polimorfismos.

Los archivos de las secuencias del exón dos del gen GDF9 fueron analizados con el software MEGA 5. Antes de realizar el alineamiento de las secuencias, fue necesario eliminar las bases iniciales y finales de cada uno de los adenogramas (Figura 7), debido a falta de definición.



Figura 7. Edición de secuencias con MEGA 5. Eliminación de las primeras 30 bases de la secuencia para su alineamiento.

Al realizar el alineamiento de las secuencias se observaron cambios de nucleótidos, Para confirmar que estos cambios no fueran debidos a errores de secuenciación se realizó la búsqueda de cada nucleótido en cada una de las secuencias. Adicionalmente a ello, de las muestras en las que se observó

superposición de bases, se realizó una nueva toma de muestras sanguínea y PCR, para descartar errores de secuenciación. En las muestras que fueron trabajadas para una nueva PCR y secuenciación, se encontró las mismas superposiciones de bases detectadas anteriormente, por lo que se consideró que no era debido a un error de secuenciación (Figura 8).



Figura 8. Adenogramas de dos productos de PCR independientes, de una misma muestra. Se puede observar la sobreposición de bases.

Es posible que la superposición de bases en el adenograma sea debida a mutaciones heterocigotas en el gen GDF9, como lo reportan otros autores (Chu *et al.*, 2011; Nicol *et al.*, 2009; Figuras 9 y 10).

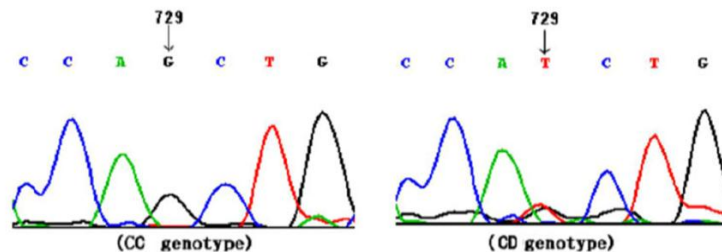


Figura 9. Genotipos reportados por Chu *et al.* (2011). La superposición de bases en la secuencia reportada, fue considerada como una mutación heterocigota para la variante G729T.

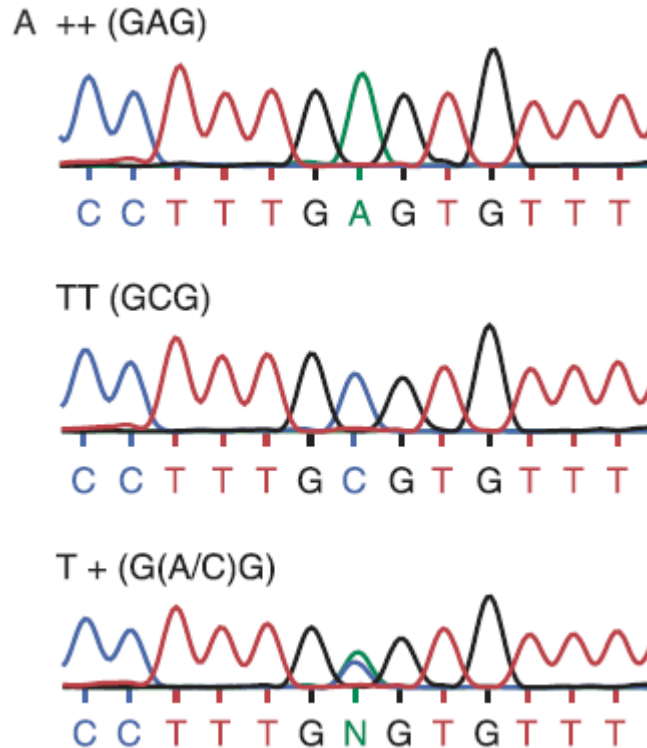


Figura 10. Genotipos reportados por Nicol *et al.* (2009). Se observa que el genotipo heterocigoto para la variante *FecT*/+ presenta superposición de bases en la secuencia reportada.

Una vez confirmado cada uno de los cambios de nucleótido, se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas, para compararlas con las del gen *GDF9* ovino disponibles en el banco de genes, reportadas por Bodensteiner *et al.* (1999) y Silva *et al.* (2010). El alineamiento permitió observar la presencia de seis mutaciones puntuales (Cuadro 1): las variantes G2, G3, G4, G6, G7, reportadas por primera ocasión por Hanrahan *et al.* (2004) en ovejas Belclare y Cambridge, las cuales no tienen efecto sobre la tasa de ovulación y las mutaciones G2, G3 y G5 no producen cambio de aminoácidos, pero G4 y G6 producen cambios de Acido Glutámico por Lisina y Valina por Isoleucina respectivamente, pero sin efecto en tasa de ovulación y prolificidad (Hanrahan *et al.*, 2004). En las secuencias analizadas también se encontró la mutación denominada *FecG<sup>Sl</sup>* o *FecG<sup>E</sup>* en la posición 1034 (Figura 11), reportada por Silva *et al.* (2010), y que



corresponde a un cambio de Timina por Guanina (Figura 12), la cual produce el cambio de aminoácido Fenilalanina por Cisteína. Esta mutación ha sido asociada al incremento de la tasa de ovulación y prolificidad en ovejas de la raza Santa Inés.

Cuadro 1. Mutaciones en el gen *GDF9* reportadas en ovejas Pelibuey.

Variante	Cambio de base	Número de base	Residuo (aminoácido)	Residuo en péptido maduro	Aminoácido cambiado	Referencia
G2	C → T	471	157	-	Val (sin cambio)	Hanrahan <i>et al.</i> (2004)
G3	G → A	477	159	-	Leu (sin cambio)	Hanrahan <i>et al.</i> (2004)
G4	G → A	721	241	-	Glu → Lys	Hanrahan <i>et al.</i> (2004)
G5	A → G	978	326	8	Glu (sin cambio)	Hanrahan <i>et al.</i> (2004)
G6	G → A	994	332	14	Val → Ile	Hanrahan <i>et al.</i> (2004)
FecG <sup>SI</sup>	T → G	1034	345	27	Phe → Cis	Silva <i>et al.</i> (2010)

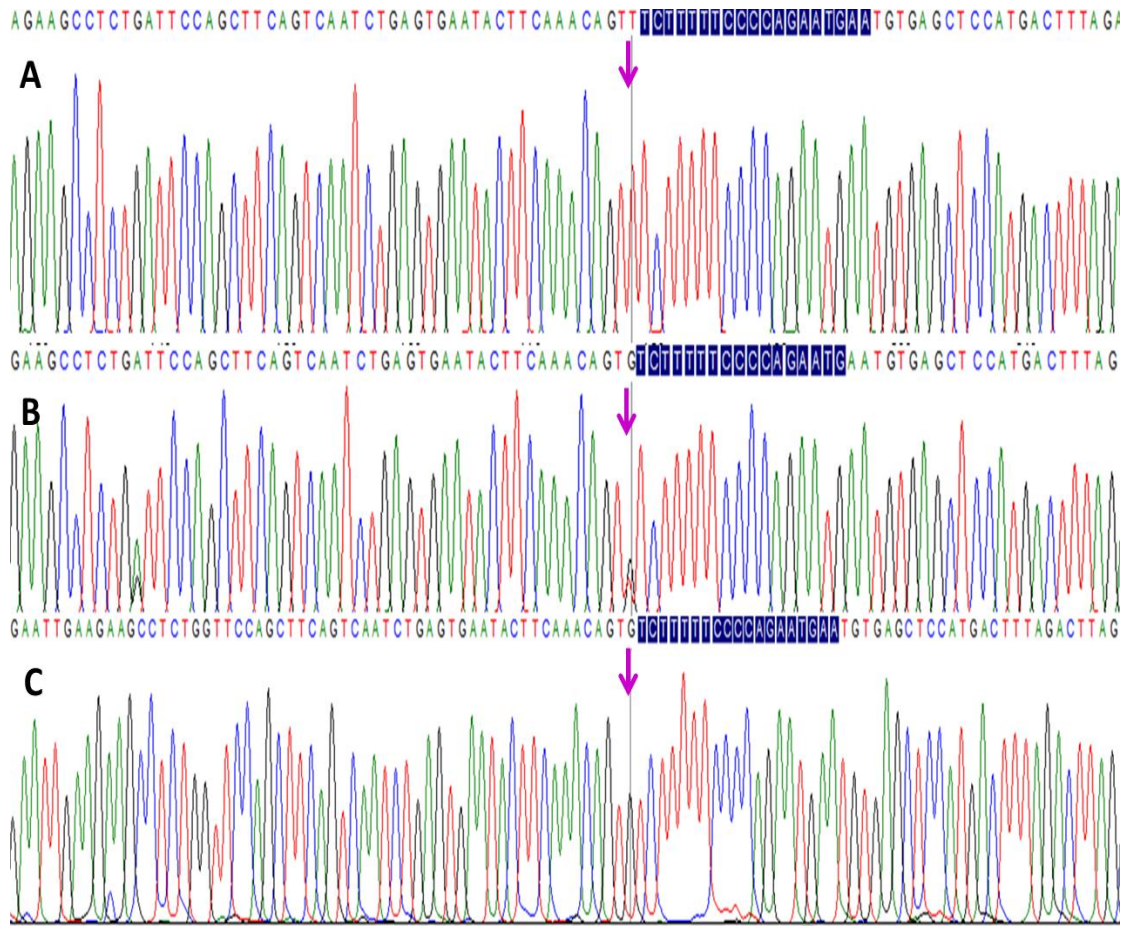


Figura 11. Adenogramas de secuencias del exón dos del gen GDF9. Se observa el polimorfismo correspondiente a la variante  $FecG^{Sl}$ : (A) genotipo silvestre (no portador). (B) genotipo heterocigoto. (C) genotipo homocigoto.

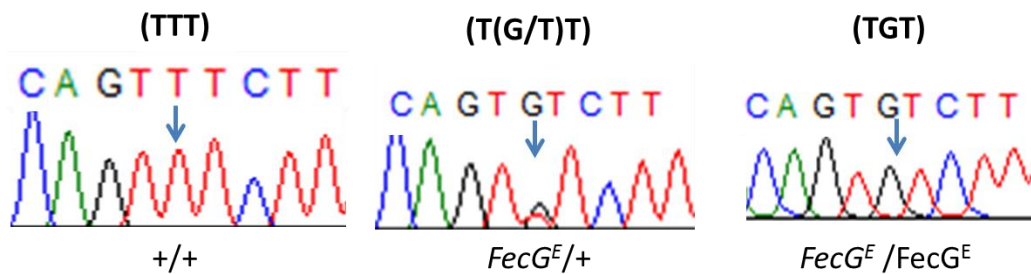


Figura 12. Adenograma de las secuencias del exón dos del gen GDF9 en las que se muestra la variante  $FecG^E$ .

Dentro de las muestras analizadas, se encontró a la variante G2 en una oveja, G3 en seis ovejas, G4 en dos ovejas, G5 en tres ovejas y  $FecG^{Sl}$  en 10 Ovejas, esta mutación es la única reportada hasta ahora en el gen  $GDF9$  para la cual el genotipo homocigoto presenta un incremento de la tasa de ovulación y prolificidad. Las ovejas homocigotas para las mutaciones  $FecG^H$ ,  $FecTT$  y  $G729T$  son estériles (Hanrahan *et al.*, 2004; Nicol *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2011).

## 5.6 Prolificidad

Al realizar el análisis del índice de prolificidad con el modelo de regresión bayesiana, para los partos uno, dos y tres no se encontraron diferencias estadísticas debidas al genotipo (Cuadro 2).

Las medias de la distribución marginal posterior del índice de prolificidad muestran que el genotipo homocigoto  $FecG^E$  tiene una media superior (de la distribución posterior) en los partos uno y dos, en comparación con los genotipos  $FecG^E/+$  y  $+/+$ , mientras que en el parto tres el genotipo  $+/+$  tiene una media mayor (distribución posterior). A pesar de ello los intervalos de probabilidad posteriores para los parámetros  $\beta_1$  y  $\beta_2$  tienen el cero incluido, lo que indica que no hay diferencias estadísticas debidas al genotipo (Figura 13).

Cuadro 2. Medias de la distribución marginal posterior e intervalo de densidad posterior, para el índice de prolificidad de los tres primeros partos en ovejas Pelibuey homocigotas E/E, heterocigotas E/+ y no portadoras +/+.

	Genotipo	Parto 1	Parto 2	Parto 3
<b>Medias</b>	E/E	2.16	2.2	2.2
<b>(distribución posterior)</b>	E/+	1.48	2.0	2.35
	+/+	1.73	1.47	2.48
<b>Intervalo posterior de densidad</b>	$\beta_1$	-2.318- 1.340	-2.043-2.284	-1.909- 2.868
	$\beta_2$	-1.858- 1.175	-2.209-0.800	-1.973-1.188

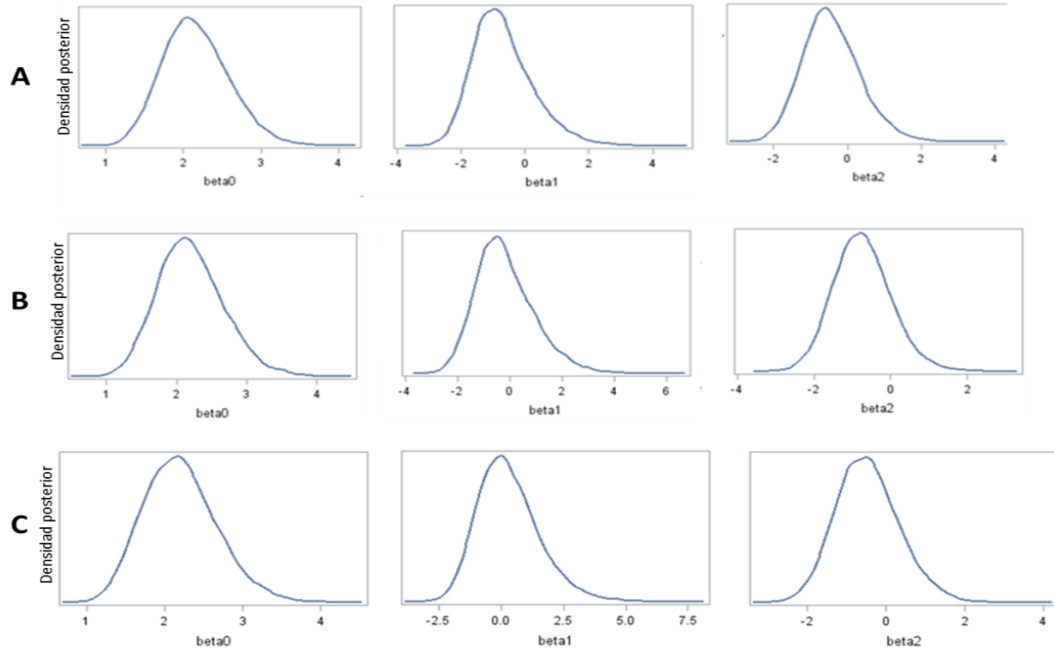


Figura 13. Representación gráfica de las distribuciones de los parámetros  $\beta_0$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$ . (A) parto 1. (B) parto 2. (C) parto 3. Los intervalos de  $\beta_1$  y  $\beta_2$  incluyen al 0 en los tres partos.

Al realizar el análisis del número de crías para cada genotipo (tres primeros partos), la distribución marginal posterior mostró que no existen diferencias estadísticas debidas al genotipo, pero si una tendencia en ovejas homocigotas para la variante  $FecG^E$ , a partir un mayor número de crías (Cuadro 3 y Figura 14).

Cuadro 3. Distribución marginal posterior e intervalo de densidad posterior, para el número de crías en tres partos, de ovejas Pelibuey homocigotas E/E, heterocigotas E/+ y no portadoras +/-.

Genotipo	Media número de crías en 3 partos	Desviación Estándar	Intervalo posterior
Homocigoto	6.0998	0.7821	4.6223- 7.6561
Heterocigoto	4.9791	1.5867	2.1730- 8.1512
Silvestre	4.4991	1.0718	2.5518-6.6695

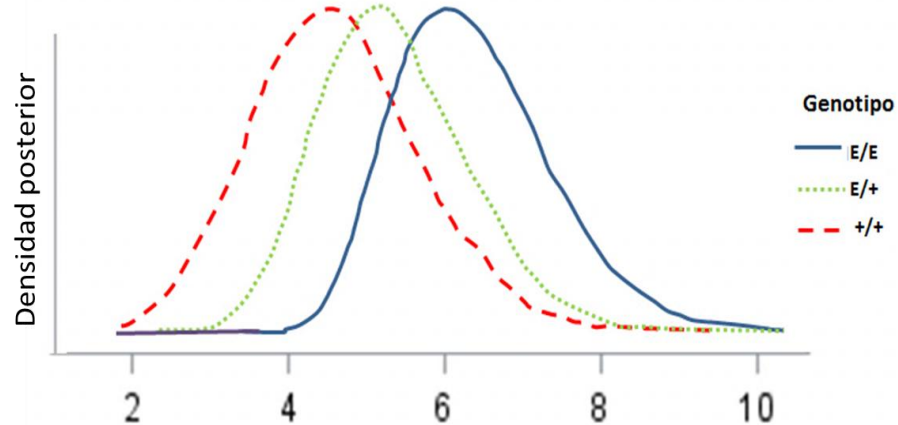


Figura 14. Distribución marginal posterior del número de crías en tres partos para los genotipos E/E, E/+ y +/+.

A diferencia de las mutaciones anteriormente reportadas en los genes de fecundidad *BMP15* y *GDF9*, con efecto sobre la tasa de ovulación y prolificidad, en las que el genotipo homocigoto es estéril y presenta falla ovárica primaria (Hanrahan *et al.*, 2004; Davis, 2005; Nicol *et al.*, 2009), la mutación *FecG<sup>Sl</sup>* en ovejas Santa Inés no produce esterilidad y fue asociada a un incremento de la TO y prolificidad en el genotipo homocigoto.

El mecanismo preciso por el cual la mutación *FecG<sup>Sl</sup>*, para el genotipo homocigoto no produce esterilidad, sino que ha sido asociado al incremento de la TO y prolificidad no es claro, pero es posible que esta mutación no produzca un efecto drástico en la disminución de la actividad de la proteína madura, comparado con los efectos producidos por otras mutaciones, lo cual hace posible que en ovejas homocigotas E/E no exista una pérdida total de la acción del GDF9. Lo anterior hace necesario continuar con la búsqueda de las acciones de la mutación *FecG<sup>Sl</sup>* en la actividad ovárica de la oveja.

La prolificidad reportada por Silva *et al.* (2010) para ovejas Santa Inés homocigotas para la variante *FecG<sup>Sl</sup>* es de 1.78 ( $1.69 \pm 1.87$ ), que fue diferente estadísticamente a los genotipos heterocigoto 1.44 ( $1.41 \pm 1.48$ ) y no portador o silvestre de 1.13 ( $1.11 \pm 1.16$ ).

## VI. CONCLUSIONES

Seis polimorfismos o SNPs fueron encontrados en el exón dos del gen GDF9 de ovejas Pelibuey. De las mutaciones reportadas, solo la variante FecG<sup>E</sup> ha sido asociada anteriormente al incremento de prolificidad.

Los resultados encontrados demuestran por primera vez la presencia de la mutación FecG<sup>E</sup> en ovejas Pelibuey. Al realizar el análisis de los datos de los tres primeros partos con un modelo de regresión bayesiano no se encontró efecto del genotipo para el índice de prolificidad, pero si una tendencia en ovejas homocigotas para esta variante, a partir un mayor número de crías.

El número de ovejas prolíficas estudiadas fue limitado, por lo que para confirmar el efecto de la mutación es necesaria la utilización de un mayor número de animales provenientes de otras regiones del país con registros de prolificidad, así como la búsqueda de mutaciones en otros genes reportados con efecto en prolificidad.

La metodología utilizada para conservación de muestras sanguíneas permitió la obtención ADN para su uso en PCR de forma fácil y rápida, por lo que puede ser recomendada en estudios posteriores.

El kit comercial de PCR directo Thermo Scientific Phusion® Blood Direct PCR Kit (Thermo Scientific Finnzymes©) es una tecnología novedosa y útil para estudios moleculares, su uso permite una adecuada amplificación de ADN mediante PCR, lo cual facilita la optimización del protocolo utilizado.

## VII. LITERATURA CITADA

- Adashi, E. 1992 Intraovarian peptides. Stimulators and inhibitors of follicular growth and differentiation. *Endocrinol Metab Clin North Am* 21 1–17.
- Beutler E, T. Gelbart, and W. Kuhl. 1990. Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotech.* 9: 166.
- Bodensteiner, K. J., C. M. Clay, C.L. Moeller, and H. R. Sawyer. 1999. Molecular cloning of the ovine growth differentiation factor-9 gene and expression of growth differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod.* 60 381–386.
- Bodin, L, M. SanCristobal, F. Lecerf, P. Mulsant, B. Bibe, D. Lajous, J. Belloc, F. Eychenne, Y. Amigues, and J. Elsen. 2002. Segregation of a major Genes for ovulation rate in sheep S21 gene influencing ovulation in progeny of Lacaune meat sheep, *Genet. Sel. Evol.* 34 447–464.
- Bodin, L., E. Di Pasquale, S. Fabre, M. Bontoux, P. Monget, L. Persani, and P. Mulsant. 2006. 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.* 148:393–400.
- Chang, H., C.W. Brown, and M.M. Matzuk. 2002. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-b superfamily. *Endocr Rev.* 23: 787–823.
- Chu, M., J. Yang, T. Feng, G. Cao, L. Fang, R. Di, D. Huang, Q. Tang, Y. Ma, and K. Li. 2011. GDF9 as a candidate gene for Prolificacy of Small Tail Han sheep. *Mol Biol Rep* 38: 5199-5205.
- Davis, G. H. 2005. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet Sel Evol* , 37 Suppl 1: S11-S23.
- Davis, G.H. , L. Balakrishnan, I.K. Ross, T. Wilson, S.M. Galloway, B.M. Lumsden, J.P. Hanrahan, M. Mullen, X.Z. Mao, G.L. Wang, Z.S. Zhao, Y.Q. Zeng, J.J. Robinson, A.P. Mavrogenis, C. Papachristoforou, C. Peter, R. Baumung, P. Cardyn, I.Boujenane, N.E. Cockett, E. Eythorsdottir, J.J. Arranz, and D.R. Notter. 2006. Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecX(I)) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. *Anim Reprod Sci* 92: 87-96.
- Davis, G.H. 2004. Fecundity genes in sheep. *Anim. Reprod. Sci.*, 82–83: 247–253.

- Davis, G.H., S.M. Galloway, I.K. Ross, S.M. Gregan, J. Ward, B.V. Nimbkar, P.M. Ghalsasi, C. Nimbkar, G.D. Gray, Subandriyo, I. Inounu, B. Tiesnamurti, E. Martyniuk, E. Eythorsdottir, P. Mulsant, F. Lecerf, J.P. Hanrahan, G.E. Bradford, and T. Wilson. 2002. DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. *Biol Reprod.* 66:1869-1874.
- Davis, G.H., G.D. Bruce, and K.G. Dodds. 2001. Ovulation rate and litter size of prolific Inverdale (FecXI) and Hanna (FecXH) sheep, *Proc. Assoc. Adv. Anim. Breed. Genet.* 14:175–178.
- Davis, G.H., J.C. McEwan, P.F. Fennessy, and K.G. Dodds. 1995. Discovery of the Inverdale gene (FecX) *Proc New Zeal Soc An.* 55: 289–290.
- Davis, G.H., J.C. McEwan, P.F. Fennessy, K.G. Dodds, K.P. McNatty, and O. WS. 1992. Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (FecXI FecXI) for the Inverdale prolificacy gene located on the X chromosome. *Biol Reprod.* 46: 636–640.
- Driancourt, M.A., I.K. Gauld, M. Terqui, and R. Webb. 1986. Variations in patterns of follicle development in prolific breeds of sheep. *J Reprod Fertil.* 78:565-575.
- Dube, J.L., P. Wang, J. Elvin, K.M. Lyons, A.J. Celeste, and M.M. Matzuk. 1998: The bone morphogenetic protein 15 gene is x-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 12, 1809–1817.
- Eppig, J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122 829–838.
- Fabre, S., A. Pierre, C. Pisselet, P. Mulsant, F. Lecerf, J. Pohl, P. Monget, and D. Monniaux. 2003. The Booroola mutation in sheep is associated with an alteration of the bone morphogenetic protein receptor- IB functionality. *J Endocrinol.* 177: 435-44.
- Fabre, S., A. Pierre, P. Mulsant, L. Bodin, E. Di Pasquale, L. Persani, P. Monget, and D. Moniaux. 2006. Review regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 12: 4-20.
- Farnworth, P.G., Y. Wang, P. Leembruggen, G.T. Ooi, C. Harrison, D.M. Robertson, and J.K. Findlay. 2006. Rodent adrenocortical cells display high affinity binding sites and proteins for inhibin A, and express components required for autocrine signalling by activins and bone morphogenetic proteins. *J. Endocrinol.* 188: 451–465.
- Faure, M.O., L. Nicol, S. Fabre, J. Fontaine, N. Mohoric, A. McNeilly, and C. Taragnat. 2005. BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. *J Endocrinol.* 186: 109–121.



- Fernandes J.V., R.V.Meissner, T.A. Fernandes, L.R. Rocha L. R., M.V. Cabral, and L. Villal. 2004. Comparação de três protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 40 141-146.
- Fitzpatrick, S., D. Sindoni, P. Shughrue, M. Lane, I. Merchenthaler, and D.Frail. 1998. Expression of growth differentiation factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and nonovarian rodent and human tissues. *Endocrinology.* 139: 2571– 2578.
- Galloway, S, K.P. McNatty, L.M. Cambridge, M.P. Laitinen, J.L. Juengel, T.S. Jokiranta, R.J. McLaren, K. Luiro, K.G. Dodds, G.W. Montgomery, A.E. Beattie, G.H.Davis, and Ritvos O. 2000. Mutations in an oocyte derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet*, 25: 279-283.
- Gui, L.M. and I.M. Joyce. 2005. RNA Interference evidence that Growth Differentiation Factor- 9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice. *Biol Reprod.* 72: 195–199.
- Hanrahan, J.P., S.M. Gergan, P. Mulsant, M. Mullen, G.H. Davis, R. Powel, and S:M. Galloway. 2004. Mutations in the genes for oocyte derived growth factors GDF 9 and BMP15 are associated with both Increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod* 70: 900-909.
- Hsueh, A., E. Adashi, P. Jones, and T. Welsh. 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev.* 5, 76-127.
- Juengel, J., N. Hudson, D. Heath, P. Smith, K. Reader, S. Lawrence, A. O'Connell, M. Laitinen, M. Cranfield, N. Groome, O. Ritvos, and K. McNatty. 2002. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod.* 67:1777– 1789.
- Juengel, J.L. y K.P. McNatty. 2005. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update.* 11: 143–160.
- Knight, P. G. y C. Glister. 2006. TGF-b superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction.* 132: 191–206.
- Laitinen, M., K. Vuojolainen, R. Jaatinen, I. Ketola, J. Aaltonen, E. Lehtonen, M. Heikinheimo, and O. Ritvos. 1998. A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogénesis. *Mech Dev.* 78: 135–140.

- Lan, Z.J., P. Gu, X. Xu, K. Jackson, F.J. Demayo, B.W O'Malley, and A.J. Cooney. 2003. GCNF-dependent repression of BMP-15 and GDF-9 mediates gamete regulation of female fertility. *EMBO J.* 22: 1–12.
- Lecerf, F., P. Mulsant, J.M. Elsen, and L. Bodin. 2002. Localization and mapping of a major gene controlling ovulation rate in Lacaune sheep. In *Proceedings of the 7th WCGALP Volume 30*. Montpellier; 30: 753-756.
- Liao, W.X., R.K. Moore, F. Otsuka, and S. Shimasaki. 2003. Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9. Implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep. *J Biol Chem.* 278:3713-3719.
- Löffler J., H. Hebart, U. Schumacher, H. Reitze, and H. Einselel. 1997. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J. Clin. Microbiol.* 35 3311-3312.
- Martinez-Royo, A. , J.J. Jurado, J.P. Smulders, J.I. Marti, J.L. Alabart, A. Roche, E. Fantova, L. Bodin, P. Mulsant, M. Serrano, J. Folch, and J.H.Calvo. 2008. A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. *Anim Genet* 39:294–297.
- Massagué, J. 1998. TGF $\beta$  signal transduction. *Annu. Rev Biochem.* 67: 753-791.
- Massague, J. and D. Wotton. 2000. Transcriptional control by the TGFbeta/ Smad signaling system. *EMBO Journal.* 19: 1745–1754.
- Matzuk, M.M., K.H. Burns, M.M. Viveiros, and J.J. Eppig. 2002. Intercellular communication in the mammalian ovary: Oocytes carry the conversation. *Science.* 296:2178–2180.
- McLaughlin, E. A. y S. C. McIver. 2009. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. *Reproduction.* 137:1–11.
- McNatty, K. ,S. Galloway, T. Wilson, P. Smith, N. Hudson, A. O'Connell, A. Bibby, D. Heath, G. Davis, J. Hanrahan, and J. Juengel. 2005. Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet Sel Evol;* 37(Suppl I): S25-S38.
- McNatty, K. P., S. Lun,D.A. Heath, K.Bal, P. Smith, N.L. Hudson, J. McDiarmid, M. Gibb, and K.M. Henderson. 1986. Differences in ovarian activity between Booroola Merino ewes which were homozygous, heterozygous and non-carriers of a major gene influencing their ovulation rate. *J Reprod Fertil.* 77:193-205.
- McNatty, K.P., N.L. Hudson, L. Whiting, K.L. Reader, S. Lun, A. Western, D.A. Heath, P. Smith, L.G. Moore, and J.L. Juengel. 2007. The effects of

- immunizing sheep with different BMP15 or GDF9 peptide sequences on ovarian follicular activity and ovulation rate. *Biol Reprod.* 76: 552–560.
- Miyazono, K., S. Maeda, and T. Imamura. 2005. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling crosstalk. *Cytokine Growth Factor Rev.* 6:251-263.
- Monteagudo, L.V., R. Ponz, M.T. Tejedor, A. Lavina, and I. Sierra. 2009. A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. *Anim Reprod Sci* 110:139–146.
- Montgomery, G.W., A.M. Crawford, J.M. Penty, K.G. Dodds, A.J. Ede, H.M. Henry, C.A. Pierson, E.A. Lord, S.M. Galloway, A.E. Schmack, J.A. Sise, P.A. Swarbrick, V. Hanrahan, F.C. Buchanan, and D.F. Hill. 1993. The ovine Booroola fecundity gene (*FecB*) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. *Nat Genet.* 4:410–414.
- Montgomery, G.W., K.P. McNatty, and G.H. Davis. 1992. Physiology and molecular genetics of mutations that increase ovulation rate in sheep. *Endocr Rev.* 13 309–328.
- Montgomery, G.W., S.M. Galloway, G.H. Davis, and K.P. McNatty. 2001. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction.* 121: 843–852.
- Mulsant, P., F. Lecerf, S. Fabre, L. Schibler, P. Monget, I. Lanneluc, C. Pisselet, J. Riquet, D. Monniaux, I. Callebaut, E. Cribiu, J. Thimonier, J. Teyssier, L. Bodin, Y. Cognie, N. Chitour, and J.M. Elsen. 2001. Mutation in the bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola ewes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 5104–5109.
- Nicholls, P.K., C.A. Harrison, R.B. Gilchrist, P.G. Farnworth, and P.G. Stanton. 2009. Growth differentiation factor 9 (GDF9) is a germ-cell regulator of Sertoli cell function. *Endocrinology.* 150: 2481–2490.
- Nicol, L., S. Bishop, R. Pong-Wong, C. Bendixen, L. Holm, S. Rhind, and A. McNeilly. 2009. Homozygosity for a single base pair mutation in the oocyte-specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *Reproduction* 138:921–933.
- Nicole Y.L., T.H. Lam, W.K. Rossa, and L.Y.M. Dennis LYM. 2004. EDTA Is a Better Anticoagulant than Heparin or Citrate for Delayed Blood Processing for Plasma DNA Analysis. *Clin. Chem.* 50: 256-257.
- Orisaka, M., J.Y. Jiang, S. Orisaka, F. Kotsuji, and B.K. Tsang. 2009. Growth Differentiation Factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis. *Endocrinology.* 150: 2740–2748.

- Otsuka, F. and S. Shimasaki. 2002. A novel function of Bone Morphogenetic Protein- 15 in the pituitary: selective synthesis and secretion of FSH by gonadotropes. *Endocrinology*. 146: 4938–4941.
- Pangas, S. and M. Matzuk. 2005. The art and artifact of GDF9 activity: cumulus expansion and the cumulus expansion-enabling factor. *Biol Reprod*. 73:582–585.
- Pennetier, S. , S. Uzbekova, C. Perreau, P. Papillier, P. Mermillod, and R. Dalbies-Tran. 2004. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. *Biol Reprod*. 71: 1359–1366.
- Piper, L. R. and B.M. Bindon. 1982. The Booroola Merino and the performance of medium non-peppin crosses at Armidale. The Booroola Merino, Proceedings of a workshop, Armidale, CSIRO :161-173.
- Piper, L.R., B.M. Bindon, and G.H. Davis, 1985. The single gene inheritance of the high litter size of the Booroola Merino. *In*: Land, R.B. and D.W. Robinson (eds.), *Genetics of Reproduction in Sheep*, pp: 115–125.
- Russel, A.J.F., S.A. Alexieva, and D.A. Elston. 1997. The effect of the introduction of the Thoka gene for fecundity on lamb production from Cheviot ewes. *Anim Sci*. 64: 503–507.
- Sadighi, M., K. Bodensteiner, A. Beattie, and S. Galloway. 2002. Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Anim Genet*. 33: 244–245.
- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.3 User’s Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Scaramuzzi, R. , N. Adams, D. Baird, B. Campbell, J. Downing, J. Findlay, K. Henderson, G.B. Martin, K.P. McNatty, A. McNeilly, and C. Tsonis. 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fert Develop*. 5: 459-478.
- Schifferli, C. ,M. Villaroel y M.V. Arruga. 2000. Obtención de DNA para el estudio de blad en toros de argentina y españa. *Arch. Zootec*. 49: 505-508.
- Shackell, G.H., N.L. Hudson, D.A. Heath, S. Lun, L. Shaw, L. Condell, L.R. Blay, and K.P. McNatty. 1993. Plasma gonadotropin concentrations and ovarian characteristics in Inverdale ewes that are heterozygous for a major gene (FecXI) on the X chromosome that influences ovulation rate. *Biol Reprod*. 48:1150-1156.
- Silva, B.D., E.A. Castro, C.J. Souza, S.R. Paiva, R. Sartori, M.M. Franco, H.C. Azevedo, T.A. Silva, A.M. Vieira, J.P. Neves, and E.O. Melo. 2010. 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.* 42: 89-92.

- Singer, V.L., T.E Lawlor, and S. Yue. 1999. Comparison of SYBR Green I nucleic gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). *Mutant Res.* 439: 37-47.
- Smith, L.M., and L.A. Burgoyne. 2004. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA® databasing paper. *BMC Ecology* 4 4-15.
- Souza, C.J.H., C. MacDougall, B.K. Campbell, A.S. McNeilly, and D.T. Baird. 2001. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. *J. Endocrinol.*, 169: R1–R6
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.
- Ten Dijke, P., O. Korchynskiy, G. Valdimarsdottir, and M.J. Goumans. 2003. Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. *Mol Cell Endocrinol* 211: 105–113.
- Veloso I.F., M.T. Lopes, C.E. Salas, and C.E. Moreira. 2000. A comparison of three DNA extractive procedures with *Leptospira* for polymerase chain reaction analysis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95 339-343.
- Vitt, U.A, S. Mazerbourg, C. Klein, and A.J. Hsueh. 2002. Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biol Reprod.* 67:473-480.
- Walling, G.A., S.C. Bishop, R. Pong-Wong, G. Gittus, A.J.F. Russel, and S.M. Rhind. 2002 Detection of a major gene for litter size in Thoka Cheviot sheep using Bayesian segregation analysis. *Anim Sci:* 75: 339–347.
- Wilson, X.Y.W., J.L. Juengel, I.K. Ross, J.M. Lumsden, E.A. Lord, K.G. Dodds, G.A. Walling, J.C. McEwan, A.R. O’Connell, K.P. McNatty, and G.W. Montgomery. 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. *Biol. Reprod.*, 64: 1225–1235.