



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

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

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**POLIMORFISMOS DE LA PROTEINA 15 MORFOGÉNICA ÓSEA
(BMP15) ASOCIADOS AL TIPO DE PARTO EN LA OVEJA
PELIBUEY**

HÉCTOR JAVIER ARGÜELLO HERNÁNDEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2013

La presente tesis, titulada Polimorfismos de la proteína 15 morfogénica ósea (BMP15) asociados al tipo de parto en la oveja Pelibuey, realizada por el alumno: Héctor Javier Argüello Hernández, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

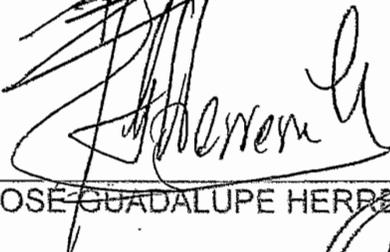
MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO


DR. CÉSAR MARTÍNEZ ROMERO

ASESOR


DR. JOSÉ GUADALUPE HERRERA HARO

ASESOR


DR. JAIME GALLEGOS SÁNCHEZ

ASESOR


DR. GILDARDO AQUINO PÉREZ

ASESOR


DR. JUAN SALAZAR ORTIZ

Montecillo, Texcoco, México, abril de 2013

POLIMORFISMOS DE LA PROTEINA 15 MORFOGÉNICA ÓSEA (BMP15) ASOCIADOS AL TIPO DE PARTO EN LA OVEJA PELIBUEY

Héctor Javier Argüello Hernández, MC.

Colegio de Postgraduados, 2013

RESUMEN

La Proteína 15 Morfogénica Ósea (BMP15), también conocida como Factor 9B de Crecimiento y Diferenciación (GDF9B), es miembro de la superfamilia β de factores de crecimiento (TGF β) y su expresión en el ovocito es esencial para el desarrollo y crecimiento folicular. Diferentes polimorfismos en el gen BMP15 han sido asociados con el incremento de tasa ovulatoria y/o prolificidad en algunas razas de ovinos. De esta manera, los objetivos para este estudio fueron determinar tres polimorfismos (FecX^G, FecX^L y FecX^H) con una mutación de una sola base (SNPs) en el gen BMP15, y estimar la asociación de los tres polimorfismos con el tipo de parto (prolificidad) en ovejas de la raza Pelibuey. Se tomaron muestras sanguíneas de la vena yugular de 253 ovejas en edad reproductiva, de acuerdo a la aptitud de producción (MPPA de prolificidad). Mediante la técnica tetraprimer ARMS-PCR (tetra primer amplification refractory mutation system) se determinaron, por primera vez, los tres polimorfismos en las ovejas Pelibuey, y en asociación con los 1050 partos, los genotipos homocigoto silvestre (CC) y mutado (TT) del polimorfismo FecX^G con un 45 % y 43 %, respectivamente; y el homocigoto silvestre (GG) y mutado (AA) del polimorfismo FecX^L con un 66 % y 29 %, respectivamente; se asociaron a un mayor número de partos dobles (P<0.01). Para el polimorfismo FecX^H, solo se encontró el genotipo homocigoto silvestre (CC) con un 51.3 % de parto doble (P<0.01). Los exones 1 y 2 del gen BMP15 fueron amplificados mediante la técnica de Polimerase Chain Reaction (PCR) y secuenciados para la búsqueda de las mutaciones en los polimorfismos (FecX^G, FecX^L y FecX^H), confirmando su ubicación en el exón 2.

Palabras clave: polimorfismos, BMP15, tetraprimer ARMs-PCR, análisis de secuencias, ovejas Pelibuey.

POLYMORPHISMS OF THE BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 15 (*BMP15*)
ASSOCIATED TO LAMBING TYPE IN THE PELIBUEY EWE

Héctor Javier Arguello Hernández. MC.

Postgraduate College, 2013

SUMMARY:

The Bone Morphogenetic Protein 15 (*BMP15*) also known as Growth Differentiation Factor 9B (*GDF9B*), is a member of the superfamily of growth factors β (*TGF β*) and its expression in the oocyte is essential for follicular growth and development. Different *BMP15* gene polymorphisms have been associated with increase ovulation rate and/or prolificacy in some sheep breeds. Thus, the aims of this study were to determine three polymorphisms (*FecX^G*, *FecX^L* y *FecX^H*) with a single base mutation (SNPs) in the *BMP15* gene, and to estimate the association of the three polymorphisms with lambing type in ewes of the Pelibuey breed. Blood samples were taken by jugular venipuncture from 253 sheep in reproductive age, according to the Most Probable Producing Ability (MPPA of prolificacy). By tetraprimer ARMS-PCR technique (tetra amplification refractory mutation system first), three polymorphisms were determined for the first time in the Pelibuey ewes, and in association with 1050 deliveries, wild homozygous genotype (CC) and mutated (TT) *FecX^G* polymorphism with a 45 % and 43 %, respectively, were associated with a greater number of twining lambing ($P < 0.01$). For *FecX^H* polymorphism, it was only found genotype homozygous wild *FecX^H* (CC) with 51.3% twining lambing ($P < 0.01$). Exons 1 and 2 of the *BMP15* gene were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique and sequenced to search of mutations in the polymorphisms (*FecX^G*, *FecX^L* and *FecX^H*), confirming its location in exon 2.

Keywords: polymorphisms, *BMP15*, tetraprimer ARMS-PCR, sequence analysis, Pelibuey ewes.

DEDICATORIA

A María Ysela Hernández Cruz mi madre.
Mis abuelos ^{Q.E.P.D.} y mi hermano menor ^{Q.E.P.D.}

“Para ser grande, hay que servir a los demás

El que entre ustedes quiera ser grande, deberá servir a los demás; y el que entre ustedes quiera ser el primero, deberá ser su esclavo. Porque, del mismo modo el hijo del hombre no vino para que le sirvan sino para servir.”

Mateo 20: 26 – 28

GRACIAS

Amat victoria perfectione

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. César Cortez Romero, por la dirección de la tesis, sin su paciencia, apoyo y tolerancia no hubiera sido posible el escrito, pero sobre todo por su amistad

Al Dr. José Guadalupe Herrera Haro, por su paciencia, apoyo, guía y su gran amistad.

A los Doctores Jaime Gallegos, Juan Salazar, Gildardo Aquino Pérez, integrantes de consejo particular, por su esfuerzo, apoyo, tiempo, dedicación y ayuda.

Al Dr. Reyna I. Rojas por su amistad y guía en el laboratorio de biología molecular.

Al Dr. Obdulia Segura por su valiosa ayuda con el análisis genómico.

A los MC. Absalon López, Carlos Mendez, Moises Camacho y Erika Lagunes, por su amistad y apoyo brindado en el análisis molecular.

Al Ing. Everardo Arturo Acevez Vega por las facilidades que me otorgaron para la obtención de muestras.

Al personal académico y administrativo del programa de ganadería.

CONTENIDO	Pag.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
3. HIPOTESIS	4
4. REVISION DE LITERATURA	5
4.1.Situación actual de la ovinocultura.....	5
4.2.Características de la raza Pelibuey.....	6
4.2.1.Peso al nacer.....	6
4.2.2.Tipo de Parto.....	6
4.2.3.Número de parto.....	8
4.2.4.Prolificidad.....	8
4.3.Ciclo estral y ovulación.....	9
4.4.Crecimiento folicular.....	11
4.5.La foliculogénesis y la determinación de la tasa ovulatoria en la oveja.....	13
4.5.1.Los folículos primordiales y comprometidos.....	13
4.5.2.Grandes folículos pre-antrales.....	15
4.5.3.Interacciones ovocito y folículo.....	15
4.5.4.El ovocito como un regulador del desarrollo folicular.....	17
4.5.5.Factores derivados de ovocito que afectan la foliculogénesis.....	20
4.6.Modelo para la regulación de la tasa ovulatoria.....	22
4.7.Mejoramamiento genético en ovinos.....	25
4.7.1.Mejoramamiento genético molecular.....	25
4.7.2.Selección asistida por marcadores moleculares.....	27
4.8.Técnicas moleculares en el análisis molecular del ADN.....	28
4.8.1.Reaccion en cadena de Polimerasa (PCR).....	28
4.8.2.Desnaturalización del ADN molde.....	30
4.8.3.Anillamiento del cebadores.....	31

4.8.4.Extensión del cebador.....	31
4.8.5.Diseño de cebadores para la PCR.....	32
4.8.6.Selección del cebador.....	32
4.9.Sistema de Amplificación Refractario de Mutaciones (Tetra primer ARMS-PCR).....	33
4.10.Genes candidatos de fecundidad.....	34
4.11.La Proteína 15 Morfogénica Ósea (BMP15).....	37
4.11.1.La Proteína 15 Morfogénica Ósea (BMP15) y su función en el ovario.....	38
4.11.2.Función del gen BMP15 en el índice de prolificidad.....	39
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	40
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
6.1.Ubicación del estudio.....	42
6.2.Mejor aptitud de producción probable, MPPA (prolificidad).....	43
6.3.Características de los animales experimentales.....	45
6.4.Colecta y conservación de muestras.....	45
6.5.Preparación de la muestra para PCR.....	46
6.6.Procedimiento de la PCR para la identificación de polimorfismos.....	48
6.7.Procedimiento de la PCR para la amplificación de los exones 1 y 2.....	52
6.8.Secuenciación.....	54
6.9.Análisis estadístico de frecuencias.....	55
6.10.Análisis de secuencias.....	55
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
7.1.Estimación de las frecuencias genotípicas y alélicas de polimorfismos del gen BMP15 (FecX ^G , FecX ^L y FecX ^H).....	56
7.2.Distribución de los partos asociados a los polimorfismos FecX ^G , FecX ^L y FecX ^H).....	60

7.3.Evaluación de las secuencias.....	66
8. CONCLUSIONES	70
9. BIBLIOGRAFIA	71
10. ANEXOS	84
A.1.Aptitud de producción (prolificidad).....	84
A.2.Programación del termociclador para los polimorfismos FecX ^G , FecX ^L y FecX ^H	86
A.3.Programación del termociclador para exón 1 y exón 2.....	87

CONTENIDO DE CUADROS		Pag.
Cuadro 1	Peso al nacer (kg) de los corderos de partos simples y múltiples. Tomado de Peron (2008).....	7
Cuadro 2	Función reguladora del líquido folicular con respuestas estimuladora o inhibidora. Modificado de Juengel <i>et al.</i> (2007); MacNatty <i>et al.</i> (2007); Lundy <i>et al.</i> (1999).....	14
Cuadro 3	Fenotipos descritos en ovinos con sus respectivos efectos sobre la tasa de ovulación y la prolificidad. Tomado de Davis (2005); Davis <i>et al.</i> , (2006); Bodin <i>et al.</i> , (2007); Chu <i>et al.</i> , (2006); Notter (2008); Jurado <i>et al.</i> , (2008); Lahoz <i>et al.</i> , (2008); Lahoz <i>et al.</i> , (2009a, 2009b) y Forgarty (2009).	36
Cuadro 4	Frecuencias genóticas y alélicas del polimorfismo FecX ^G en el gen BMP15 de ovejas Pelibuey.....	56
Cuadro 5	Frecuencias genóticas y alélicas del polimorfismo FecX ^L en el gen BMP15 de ovejas Pelibuey.....	58
Cuadro 6	Distribución de los partos asociada a las frecuencias genóticas del polimorfismo FecX ^G en el gen BMP15 de ovejas Pelibuey.....	62
Cuadro 7	Distribución de los partos asociada a las frecuencias alélicas del polimorfismo FecX ^G en el gen BMP15 de ovejas Pelibuey.....	63
Cuadro 8	Distribución de los partos asociada a las frecuencias genóticas del polimorfismo FecX ^L en el gen BMP15 de ovejas Pelibuey.....	64
Cuadro 9	La distribución de partos asociada a las frecuencias alélica del polimorfismo FecX ^L en el gen BMP15 de ovejas Pelibuey.....	65

CONTENIDO DE FIGURAS

		Pag.
Figura 1	Población total de ovinos (cabezas) por estados. Modificada de SAGARPA (2012).....	5
Figura 2	Relación entre el tipo de parto S (simple), D (doble) y T (triple) en el peso al nacer de los corderos. Tomada de Peron (2008).....	6
Figura 3	Relación entre el número de partos y el peso al nacer de los corderos. Modificado de (Peron, 2008).....	7
Figura 4	Dinámica folicular durante el ciclo estral de la oveja. Modificado de Arroyo <i>et al.</i> (2006).....	9
Figura 5	El “pico” preovulatorio de LH precede a la ovulación por aproximadamente 24 h. Modificado de Arroyo <i>et al.</i> (2006).	11
Figura 6	Resumen de foliculogénesis en la oveja. Modificado de Lundy <i>et al</i> 1999; Scaramuzzi <i>et al</i> 2011 y McNatty (datos sin publicar).....	16
Figura 7	Modelo de foliculogénesis en la oveja. Modificado de Scaramuzzi <i>et al</i> (1993).....	17
Figura 8	Esquema que ilustra el carácter complejo y altamente integrado de la foliculogénesis involucrando interacciones entre el ovocito y las células granulosas de los folículos en desarrollo. Modificado de Scaramuzzi <i>et al.</i> (1993).....	18
Figura 9	Ancho de la ventana determinado por el periodo de tiempo que las concentraciones de FSH superaron el umbral crítico necesario para prevenir la atresia. Modificado de Baird <i>et al.</i> (1998).....	24
Figura 10	Aumento de la tasa de ovulación mediante el aumento de la anchura de la ventana. Modificado de Baird <i>et al.</i> (1998).	24
Figura 11	Aumento del número de folículos dependientes de gonadotropina que están listos para pasar a través de la ventana. Modificado de Baird <i>et al.</i> (1998).....	25

Figura 12	Fases de la amplificación por PCR. Tomado de Vierstraete (1993).....	29
Figura 13	Amplificación exponencial del DNA mediante PCR. Tomado de Vierstraete (1993).....	30
Figura 14	Fundamento de tetraprimer ARMS-PCR. Tomado de Zenteno (2009).....	33
Figura 15	Ubicación del rancho “El Tesoro”, Campeche, Campeche...	43
Figura 16	Grupo de ovejas de la raza Pelibuey.....	45
Figura 17	Colecta de muestras sanguíneas de acuerdo a los registros de la mejor aptitud de producción probable (MPPA) en prolificidad.....	46
Figura 18	Medición de absorbancia del DNA en las observaciones....	47
Figura 19	Esquema del Sistema tetraprimer ARMS-PCR para la identificación de alelos de un SNP (polimorfismo de un nucleótido simple).....	49
Figura 20	Preparación de las observaciones para la utilización de la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).....	50
Figura 21	Electroforesis para detectar los alelos (FecXG, FecXH y FecXL) con la técnica tetraprimer ARMS PCR.....	52
Figura 22	Esquema de la amplificación para la identificación del exón 1 y exón 2.....	53
Figura 23	Visualización del exón 1 y exón 2.....	54
Figura 24	Envío de las observaciones del exon1 y exón 2 a secuenciar.....	55
Figura 25	Gel de poliacrilamida al 8 % mostrando el resultado de la tetraprimer ARMS-PCR para el polimorfismo en FecXG. Homocigoto mutado T/T (+/+; 112pb) y heterocigoto C/T óT/C (-/+ ó +/-; 102 y 112 pb) , marcador de 50 pb.....	57
Figura 26	Gel de poliacrilamida al 8 % mostrando el resultado de la	

	tretraprimer ARMS-PCR para el polimorfismo en FecXL. Homocigoto silvestre AA (-/-; 204 pb) y heterocigoto GA ó AG (-/+ ó +/-; 252 pb y 204 pb) , marcador de 50 pb.....	58
Figura 27	Gel de poliacrilamida al 8 % mostrando el resultado de la tretraprimer ARMS-PCR para el polimorfismo en FecXH. Homocigoto silvestre CC (-/-; 203 pb) , marcador de 50 pb..	59
Figura 28	Alineamiento de secuencias del polimorfismo FecXG.....	67
Figura 29	Alineamiento de secuencias del polimorfismo FecXL.....	68
Figura 30	Alineamiento de secuencias del polimorfismo FecXH.....	69

1. INTRODUCCIÓN

En México, la ovinocultura cuenta con una población de 8.2 millones de cabezas de ovinos (SIAP, 2011; SAGARPA, 2012). Dicha población de ovinos tiene un constante crecimiento a causa de la amplia gama de condiciones agroclimáticas, de recursos alimenticios y genéticos, que ha permitido iniciar la organización de los procesos productivos, tomando en consideración las ventajas biológicas y económicas de cada actividad y región, así como los patrones de consumo de carne y la infraestructura para su transformación SAGARPA (2012).

Se han identificado veinte razas de ovinos en el país, tanto de pelo como de lana recién introducidas, entre las cuales destacan; Criollo, Hampshire, Pelibuey y Suffolk, siendo las más usadas y adaptadas. Sin embargo, solo las razas Dorset, Hampshire, Pelibuey, Rambouillet y Suffolk han participado en pruebas de comportamiento, aunque la disponibilidad de sementales o semen con evaluaciones genéticas es limitada. Y solo un 40% de las razas mencionadas anteriormente utiliza la inseminación artificial y la transferencia de embriones. Aun con el escaso desarrollo en la implementación de biotecnología, dentro de las prioridades nacionales se plantea la utilización de un laboratorio de genética molecular de referencia, para promover la identificación de genes deseables e indeseables, con el fin de completar los resultados de evaluaciones genéticas, y ofrecer un valor económico agregado (SAGARPA, 2010; 2011; SIAP, 2011).

En los últimos años, las ovejas de pelo, principalmente conformadas por las razas Pelibuey y Black Belly, son una fuente importante para el abastecimiento de carne en México (Castillo *et al.*, 1972; Peron *et al.*, 1991; Galina *et al.*, 1996; Segura *et al.*, 1996; Dickson *et al.*, 2004; Macedo y Castellanos, 2004; Pérez *et al.*, 2005). Las razas de pelo, se han popularizado entre otras razones por su rusticidad, precocidad, fertilidad y adaptación a diferentes situaciones de manejo, ya sea intensivo o extensivo (González-Reyna *et al.*, 1991), de manera exclusiva en la región tropical. En particular, la raza Pelibuey es considerada, además de su rusticidad, una de las razas prolíficas en México. No obstante, su prolificidad o

tamaño de camada es relativamente baja comparada con algunas razas de lana y de pelo. Se han realizado varios estudios sobre variables reproductivas, y en específico para el caso de prolificidad, se reportan valores desde 1.16 hasta 2.20, descritos por Castillo *et al.* (1972); Mejía *et al.* (1991); Segura *et al.* (1996); Galina *et al.* Mejía *et al.* (1991); Dickson *et al.* (2004); Perez *et al.* (2005) y Macedo y Alvarado, (2005). Lahoz *et al.* (2011) indicó que el aumento de la prolificidad es una de las vías para mejorar la competitividad de la producción y adaptar el sector ovino al mercado.

En los últimos años, los incrementos de precios para la alimentación del ganado, los bajos precios que el productor percibe, el bajo consumo de carne por habitante, la falta de relevo generacional y los continuos cambios de la Política Agraria, afectan la producción. Para adaptarse a la nueva situación social y de mercado, la principal herramienta que tienen los ganaderos es aumentar la competitividad de la producción. Una de las vías es incrementar la prolificidad; con énfasis en la tasa de ovulación, ambas influidas por factores genéticos y por multitud de factores ambientales. Entre los factores ambientales cabe destacar la edad, el estado fisiológico, el estado nutricional, el balance energético de la dieta, el fotoperiodo, factores socio-sexuales (como el efecto macho), la temperatura, la humedad relativa o el estrés; Además, es importante el manejo de cada explotación con sus diferentes sistemas de ordenación de cubriciones y programas sanitarios. En cuanto al control genético, la tasa de ovulación y la prolificidad están reguladas por un conjunto de genes de pequeño efecto (poligen) y por la acción de genes mayores que tienen un gran efecto sobre la tasa de ovulación. La herencia mixta de la prolificidad como la suma de la herencia poligénica, más la de un gen mayor, se ha demostrado por diversos autores.

Galloway *et al.* (2000); Lahoz *et al.* (2011) y Scaramuzzi *et al.* (2011) indicaron que el sistema de la Proteína Morfogénica Ósea (BMP, Bone Morphogenetic Proteína), al cual pertenece BMP15 (Proteína 15 Morfogénica Ósea), también llamado Factor 9B de Crecimiento y Diferenciación (FecX o GDF9B, Growth

Differentiation Factor 9B), desempeña un papel fundamental en la foliculogénesis, modulando la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y de la teca en respuesta a la estimulación por gonadotropinas, produciendo un gran número de variaciones a nivel intrafolicular. Esta mutación induce una maduración precoz de los folículos ováricos, al incrementar su sensibilidad a la FSH, y no por un incremento de la concentración de la FSH circulante, lo cual favorece su selección. Como consecuencia, en las ovejas portadoras de la mutación, se producirá la ovulación y luteinización de numerosos folículos maduros de menor tamaño, con una sensibilidad precoz a la LH, lo que conducirá a una mayor tasa de ovulación.

El gen conservado en ovinos BMP15, incrementa la tasa de ovulación en alrededor de un óvulo extra y el tamaño de la camada de alrededor de 0.6 corderos por parto. Este gen es conservado, se infiere la presencia y su polimorfismo influye que los animales sean prolíficos, no prolíficos y de partos simples. Aunado que a la fecha no hay información de estudios realizados sobre genes relacionados con tasa ovulatoria y prolificidad en la raza Pelibuey, se pretende estudiar la participación del gen BMP15 en ovejas con historial de registros productivos y reproductivos, para su futura selección. Con base en lo anterior, se plantean como objetivos determinar polimorfismos del gen BMP15 y estimar su relación con el tipo de parto (prolificidad) en ovejas adultas de la raza Pelibuey.

2. OBJETIVOS

1. Determinar polimorfismos del gen BMP15 en ovejas adultas de la raza Pelibuey, relacionados con tasa ovulatoria y prolificidad.
2. Estimar la asociación de polimorfismos del gen BMP15 con el tipo de parto en ovejas adultas de la raza Pelibuey.

3. HIPÓTESIS

Existen polimorfismos en el exón 1 y exón 2 del gen BMP15 en ovejas adultas de la raza Pelibuey, relacionados con tasa ovulatoria y prolificidad.

Los diferentes polimorfismos del gen BMP15 están asociados al tipo de parto en ovejas adultas de la raza Pelibuey.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1.Situación actual de la ovinocultura

En México, no se cuenta con un censo por razas ovinas, solo se tiene el censo de ganado ovino de manera general, con 8,219,386 cabezas; siendo el Estado de México, el de mayor población con 1,307,371 cabezas de ovinos, que equivalen al 16 % de la población, seguido por el estado de Hidalgo con 1,099,773 cabezas de ovinos que equivalen al 13 %, Veracruz con 665,145 cabezas de ovinos que equivalen al 8 %, Oaxaca con 500,169 cabezas (6 %), Puebla con 452,544 (6 %), San Luis Potosí con 404,262 (5 %) y Zacatecas con 368,093 cabezas (4 %), los otros estados con 3,422,029 cabezas de ovinos equivalen al 42 % (Figura 1; SIAP, 2011; SAGARPA, 2012). Según el último informe de SIAP (2011) y SAGARPA (2012) mencionan que la venta de ganado en pie equivale a 108,658 ton con un precio por kg de \$23.01 con peso de 34 kg, resultando un valor de \$2,500,421 miles de pesos. En rastros, la producción cárnica de la canal es de 54,966 ton con un precio por kg de \$46.00 con un peso al sacrificio de 20 kg, dando un valor de producción de \$2,528,482 miles de pesos.

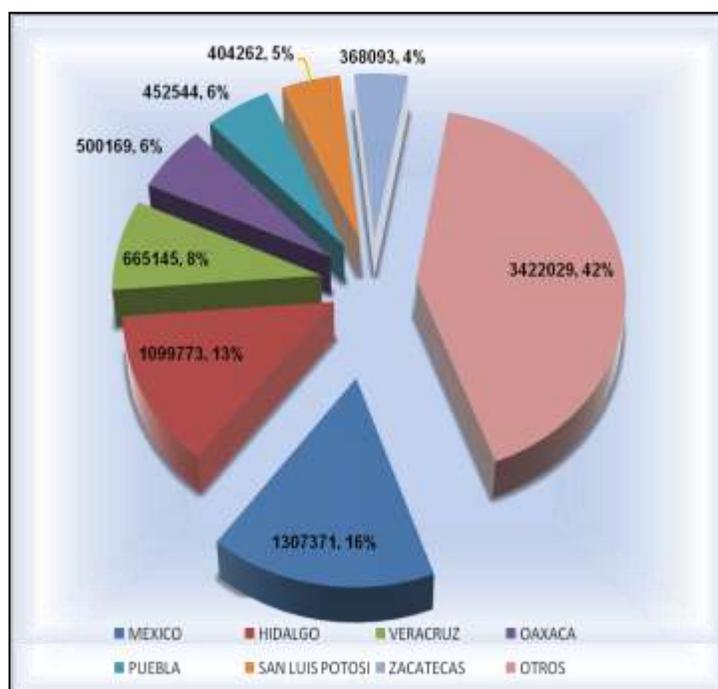


Figura 1. Población total de ovinos (cabezas) por estados. Modificada de SAGARPA (2012).

4.2. Características de la raza Pelibuey

La aparición del ovino Pelibuey en México fue gracias a que estos animales fueron traídos de Cuba, por su alta adaptación a las condiciones del trópico. Además, debido principalmente a su buen comportamiento reproductivo y alta supervivencia, en relación con otras razas ovinas. Las ventajas de esta especie para convivir en grupo, fácil manejo, canales pequeñas de fácil almacenaje y bajo gasto para iniciar este tipo de producción, se convirtió en un genotipo con amplias posibilidades de integración a sistemas silvopastoriles y agrosilvopastoriles; lo cual tuvo un impacto en la producción de proteína de alta calidad, para la alimentación humana (Peron, 2008).

4.2.1. Peso al nacer

Según Peron (2008), se indica un promedio de 2.85 kg de peso al nacer de los corderos Pelibuey, con un rango entre medias de 2.3 a 3.4 kg. Los aspectos que más influyen en este rasgo son: el régimen alimentario de las ovejas, la época de parto, tipo de parto, sexo, número de partos, peso y la condición corporal de las ovejas; con una tendencia de mayor peso al nacer en los corderos de ovejas alimentadas a base de forraje más un suplemento de concentrado, 3.08 kg en comparación con 2.87 kg que pastorean. Aguilar *et al.* (1995) y Fonseca *et al.* (2000a) mencionan que cuando aumenta el nivel alimentario de la ovejas Pelibuey durante el último período de gestación, incrementa el peso al nacer de los corderos en condiciones de pastoreo.

4.2.2. Tipo de parto

Lima *et al.* (1987) y Ramírez *et al.* (1992a) reportan que se tiene un efecto altamente significativo del tipo del parto en el peso al nacer; los corderos de partos dobles fueron 22 y 12 % menos pesados, y de partos triples 44 y 37 % menos pesados que los de partos simples, respectivamente (Figura 2). Diferencias similares encontraron Kadysky y Leon, (1984); Capote *et al.* (1990a); Costa *et al.* (2000) y Rico *et al.* (2001) en el peso al nacer (kg) de los corderos de partos simples y múltiples (Cuadro 1).

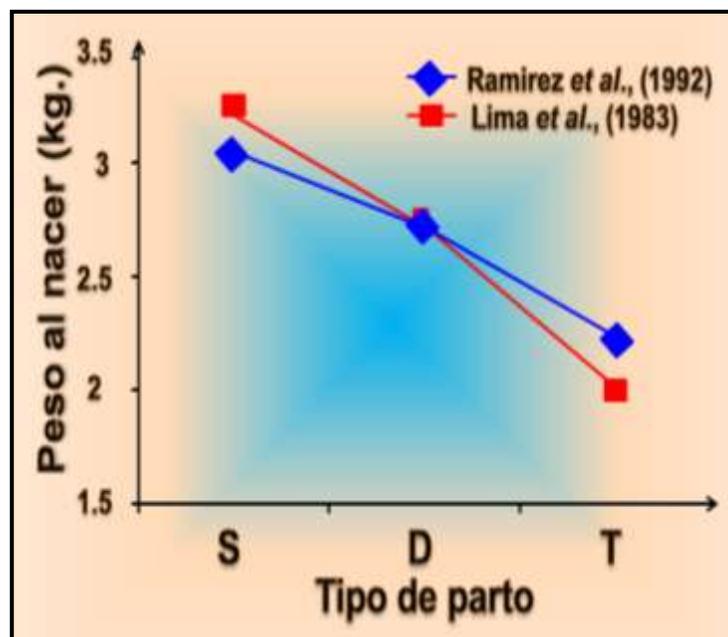


Figura 2. Relación entre el tipo de parto S (simple), D (doble) y T (triple) en el peso al nacer de los corderos. Tomada de Peron (2008).

Cuadro 1. Peso al nacer (kg) de los corderos de partos simples y múltiples. Tomado de Peron (2008).

Autores	Número de animales	Partos	
		Simple	Múltiples
Kadysky y Leon, (1984)	1 975	3.06	2.44
León y Sotto, (1985)	4 191	3.21	2.70
Aguilar <i>et al.</i> (1995)		3.18	2.74
Rico y Planas, (1996)	510	2.62	2.06
Costa <i>et al.</i> (2000)	608	3.01	2.47
Fonseca <i>et al.</i> (2000a)		3.17	2.91
Rico <i>et al.</i> (2001)	544	2.17	2.21

4.2.3. Número de partos

En el caso de número de partos, Lima *et al.* (1987) mencionan que el peso al nacer más bajo se observó en las ovejas del primer parto y se incrementó de forma significativa en las ovejas del segundo parto, pero no difirió en aquellas del tercer y cuarto parto (Figura 3).

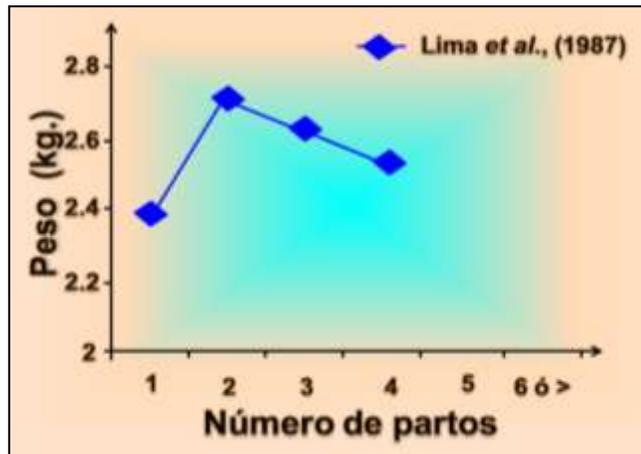


Figura 3. Relación entre el número de partos y el peso al nacer de los corderos, Modificado de (Peron, 2008)

4.2.4. Prolificidad

En ovejas Pelibuey, González *et al.* (1991) menciona que la prolificidad es muy baja, comparada con razas lanares y con otras razas de ovinos de pelo, como es la raza Barbados BlackBelly, donde se registran valores para primiparas de 1.40 ± 0.08 , ovejas de 2 a 4 años con 1.67 ± 0.06 , ovejas adultas de 5 a 6 años con 1.75 ± 0.07 y ovejas de 8 a 10 años con 1.80 ± 0.29 corderos (Rojas y Rodríguez, 1995). Otros estudios reportan índices de prolificidad para la raza Pelibuey de 1.16, 1.19 ± 0.04 , 1.2 ± 0.39 , 1.22-1.43, 1.23, 1.55 ± 0.35 y 2.20, según Castillo *et al.* (1972), Mejía *et al.* (1991), Segura *et al.* (1996), Galina *et al.* (1996), Dickson *et al.* (2004), Macedo y Castellanos, (2004) y Pérez *et al.* (2005), respectivamente.

La prolificidad promedio es de 1.77 ± 0.6 . Esta cifra es muy superior a lo reportado por Pérez, (1987) hace muchos años para esta raza; donde se encontraron diferencias debidas a la edad, las corderas de reemplazo al primer parto tuvieron

una prolificidad menor de 1.40 ± 0.08 ($P < 0.01$) respecto a edades mayores de 2 a 4 años con 1.67 ± 0.06 de 5 a 7 años con 1.75 ± 0.07 y de 8 a 10 años con 1.80 ± 0.29 , las cuales fueron similares entre sí ($P > 0.05$). Al igual, De Lucas *et al.* (2012) reporta dentro de los parámetros reproductivos en ovejas Pelibuey una prolificidad promedio de 1.77 ± 0.6 . El comportamiento de las ovejas primíparas ha sido similar a lo reportado por otros autores como Cárdenas *et al.* (1987) o Pérez (1987).

4.3. Ciclo estral y ovulación

El ciclo reproductivo anual de la oveja incluye un periodo en donde ciertos acontecimientos neuroendocrinos en secuencia finalizan en ovulación, observado en época reproductiva (Gallegos-Sánchez *et al.*, 1999). Barrell *et al.* (1992) aludieron que existe un cierto periodo en el que no hay ovulación, nombrándolo época de anestro o inactividad reproductiva. En época reproductiva aumenta la frecuencia de pulsos GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) y LH (hormona luteinizante, luterisante ó luteoestimulante), lo que provoca la ovulación, conocido como “pico” preovulatorio.

Al finalizar la fase lútea (luteólisis), por efecto de la acción de la prostaglandina ($PGF_{2\alpha}$) liberada por el endometrio uterino, la concentración en plasma sanguíneo de progesterona (P_4) desciende, y esta disminución favorece la secreción tónica de LH, causando un aumento en la frecuencia de los pulsos de LH progresivamente, hasta llegar a un pulso cada hora. Asimismo, se incrementa la frecuencia de secreción de LH, estimulando la síntesis de Estradiol (E_2) en los folículos en proceso de madurar e incrementa la concentración de E_2 en circulación general. El incremento progresivo de los niveles de E_2 efectuado por el mecanismo de retroalimentación positiva a nivel hipotalámico, estimula la secreción en las descargas preovulatorias de la dupla GnRH/LH (Figura 4; Padilla *et al.*, 1988; Barrell *et al.*, 1992; Gallegos-Sánchez *et al.*, 1999).

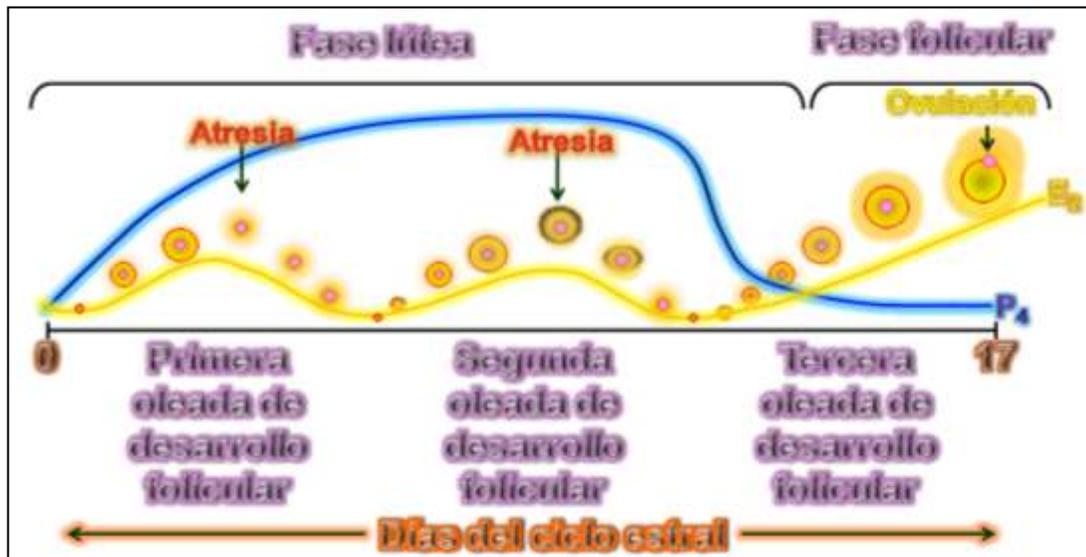


Figura 4. Dinámica folicular durante el ciclo estral de la oveja. En la fase lútea existe folículos en desarrollo, los cuales sufren atresia. Los folículos en desarrollo durante esta etapa secretan estradiol (E₂); sin embargo, la progesterona (P₄) inhibe la secreción pulsátil de LH a nivel central y esto impide la maduración folicular y la ovulación. Durante la fase folicular, cuando la concentración de P₄ disminuye, el E₂ secretado por los folículos en desarrollo estimula la secreción pulsátil de LH y se ejerce un sistema de retroalimentación positivo, favoreciendo la maduración folicular y ovulación. Por lo general se observan dos otras oleadas foliculares durante el ciclo estral de la oveja. Modificado de Arroyo *et al.* (2006).

Las fluctuaciones de concentraciones circulantes de E₂, se originan en folículos ováricos, las cuales pueden desarrollarse o atresarse durante cada ciclo (Figura 5; Legan and Karsch, 1979; McNatty *et al.*, 1984; Noel *et al.*, 1993; Ravindra and Rawlings, 1997; Souza *et al.*, 1997; Bartlewski *et al.*, 2000 y Evans *et al.*, 2000). De esta manera, Legan y Karsch, (1979) indican que el estro se asocia al pico preovulatorio de LH, el cual se anticipa aproximadamente 24 h a la ovulación. Mientras tanto, Karsch *et al.* (1997) reportan que el evento anterior necesita un incremento de secreción GnRH hipotalámica y aumento de sensibilidad hipofisaria, estos sucesos son dependientes de E₂. Asimismo, Caraty *et al.* (2002) hicieron referencia que el estímulo generado por GnRH para que ocurra el pico de LH, está determinado directamente de la concentración y perfil de secreción de la GnRH, del sistema porta hipofisario en oveja. Los picos preovulatorios de GnRH y LH ocurren en paralelo, con la diferencia del pico de GnRH que se extiende 36h a 48h, tiempo aproximado de la duración del estro. Pfaff *et al.* (1994) aludieron que,

probablemente la secreción se prolonga y representa un exceso fisiológico, que influye en cambios del estímulo hipofisario, donde la GnRH tiene control de la conducta sexual y la ovulación. En ovejas, Blache *et al.* (1994) indican que los cambios conductuales y secreción de LH, estimulan el incremento en la concentración de E₂ secretado por folículos en desarrollo durante la fase folicular. Otro componente relacionado en el control de la conducta del estro, es la P4 presente en fase lútea, con un incremento en el número de receptores a E₂ en hipotálamo medio basal MBH (hipotálamo medio basal) y sensibilidad mayor a E₂. En fin, Arroyo *et al.* (2006) reportan que la actividad neuronal de GnRH, se prolonga durante fase folicular del ciclo estral, con el propósito de mantener la receptividad sexual hasta la ovulación, post efecto inicial de E₂.

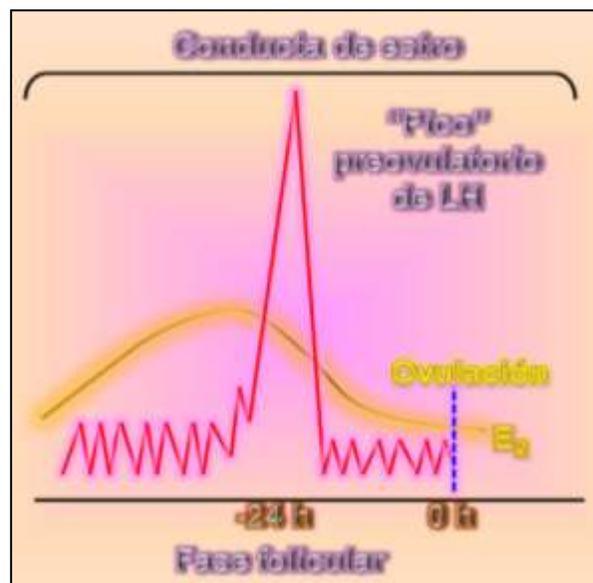


Figura 5. El “pico” preovulatorio de LH precede a la ovulación por aproximadamente 24 h. El estradiol (E₂) circulante, secretado por los folículos en crecimiento, ejerce un efecto de retroalimentación positiva en el hipotálamo medio basal, estimulando la secreción de GnRH y LH. Lo cual favorece la maduración folicular, incrementa la secreción pulsátil de LH, induce la conducta de estro y la ovulación. Modificado de Arroyo *et al.* (2006).

4.4.Crecimiento folicular

El crecimiento y la maduración folicular son regidas por varios factores intraováricos, intrafoliculares y señales hormonales, que conducen a la secreción

de andrógenos y estrógenos, principalmente E_2 (Testart *et al.*, 1982). Testart *et al.* (1982) y Hafez y Hafez, (2002) mencionan que el crecimiento folicular interviene en la proliferación y diferenciación, inducidas por hormonas de las células de la teca y de la granulosa, a la vez, causa un incremento en la capacidad de los folículos para producir E_2 y reaccionar a la gonadotropina. La producción de E_2 determina que folículo adquiere los receptores de LH necesarios para la ovulación y la luteinización. Las perturbaciones en la respuesta de las células de la granulosa y de la teca, a las señales de GnRH, interrumpen el crecimiento folicular, para posteriormente originar la atresia del folículo. El crecimiento del folículo hasta la etapa de formación del antro, espacio lleno de líquido, no es dependiente de GnRH; sin embargo, la formación del antro y el crecimiento final depende por completo de FSH/LH.

Hafez y Hafez, (2002) reportan que los componentes del folículo, con características morfológicas y fisiológicas, apoyan al desarrollo del folículo y la maduración del ovulo. Las células de la teca, producen andrógenos en respuesta al incremento de los niveles basales de LH y, después de la ovulación se transforman en células lúteas de la teca. La pared folicular se ha formado por células de la granulosa y de la teca, separadas por la lámina basal. Las células de la granulosa, en los folículos *pre* ovulatorios, tienen proyecciones a través de la lámina basal. Y después de la ovulación, la capa de la granulosa es invadida por vasos y material conectivo. La corona radiata, se forma antes de la ovulación y se encuentra en un extremo del folículo ovárico del óvulo, inmerso en una masa sólida de células foliculares y el montículo ovárico "*cumulus oophorus*". El folículo primordial, folículo con oocitos localizados en el centro y una sola capa de células de la granulosa, se diferenció a partir de células germinales primordiales (oogonios) y permaneció en una profase meiótica suspendida hasta que reanudó su maduración, ovulación y atresia; al comenzar el crecimiento folicular, le acompañó la proliferación de células de la granulosa, la formación de la zona pelúcida y la diferenciación de las células teca. El folículo secundario, en esta etapa ha aumentado el número de células de la granulosa por mitosis, dichas

células se hicieron cuboides. El folículo vesicular, es el folículo donde se acumuló el líquido folicular en el antro, dentro de las células epiteliales. El líquido folicular en el antro, alguno de sus componentes tiene actividad fisiológica de inhibidores de la maduración de oocitos, inhibidores de la unión de LH, inhibina, diversas enzimas y ácido sulfúrico de condroitina. Los folículos grandes solo contiene un elevado porcentaje de $17\beta\text{-E}_2$ en la fase folicular, donde se presenta P4 durante la ovulación. El líquido folicular entre las células de la granulosa, es viscoso y rico en ácido hialurónico, el cual se acumula a medida que se presenta la ovulación.

4.5.La foliculogénesis y la determinación de la tasa ovulatoria en la oveja

Dentro de las funciones del ovario, en la producción cíclica de óvulos fecundables y la producción de una proporción balanceada de hormonas esteroides, que mantienen el desarrollo del aparato reproductor, facilitando la migración, la implantación y el desarrollo exitoso del embrión en el útero, el folículo fue el compartimiento ovárico que permitió al ovario cumplir su doble función de gametogénesis y esteroidogénesis. La foliculogénesis es el proceso a través del cual se forman los folículos, los cuales atraviesan por diferentes etapas de crecimiento y desarrollo, hasta originar un folículo de Graff (Fortune, 1994; Picazo *et al.*, 1995; Hafez y Hafez, 2002; Scaramuzzi *et al.*, 2011). Scaramuzzi *et al.* (2011) menciona que el concepto de cinco clases de desarrollo en los folículos se mantiene en: primordial, comprometidos, de respuesta a gonadotropina, dependientes de gonadotropina y ovulación. En rumiantes, la tasa de ovulación se encuentra regulada y rara vez excede a tres ovulaciones al mismo tiempo; determinante importante para el tamaño de la camada.

4.5.1. Los folículos primordiales y comprometidos

Sawyer *et al.* (2002) reportan que los folículos primordiales no se inactivan y que el proceso que conduce a formación de folículos es llevado a cabo durante la vida fetal. En ovinos, el crecimiento folicular inicia antes de que los últimos folículos primordiales estén formados y luego continúan a lo largo de la vida fetal, neonatal

y adulta. La demora entre la aparición de los primeros primordiales y los folículos primarios, es relativamente larga, *post* 25 días (McNatty *et al.*, 2007). Folículos primordiales fueron utilizados para generar 2500 etiquetas de secuencias, se adaptaron a 500 mRNA, que se vincularon a los acontecimientos del citoesqueleto, la reparación del DNA, el procesamiento del mRNA, función ribosomal, síntesis de proteínas, ubiquitinación y vías de señalización. Algunos ejemplos son: genes expresados en oocitos, células de la granulosa y células de la teca en folículos primordiales, primarios y *pre* antral (Cuadro 2). Esto indica que el folículo primordial expresa cientos de genes que cumplen funciones de limpieza y señalización.

Cuadro 2. Función reguladora del líquido folicular con respuestas estimuladora o inhibidora. Modificado de Juengel *et al.* (2007); McNatty *et al.* (2007); Lundy *et al.* (1999).

Primordial (Tipo 1)	Primario (Tipo 2)	Preantral (Tipo 3)	Preantral (Tipo 4)
ALK3 ^{†,¶}	ActRIIB [¶]	ActRIIB [*]	AR ^{¶,*}
ALK5 [†]	ALK6 [¶]	ALK3 [*]	3βHSD [*]
ALK6 [†]	AMH [¶]	ALK5 ^{¶,*}	ERα [¶]
Betaglicano [†]	AMHRII [¶]	ALK6 [*]	ERβ [*]
3βHSD [¶]	βB activina [¶]	Betaglicano ^{¶,*}	IGF2 [*]
BMP6 [†]	BMP15 [†]	BMPRII [*]	α Inhibina [¶]
BMPRII ^{†,¶}	Connexin 43 [¶]	Folistatina [¶]	LHR [*]
c-kit [†]	FIGα [†]	FSRP ^{¶,*}	PR [*]
Connexin 37 [†]	FSH-R [¶]	IGFR1 [*]	SF [*]
ERβ ^{†,¶}	IGFRI [¶]	TGF-β1, 2 [*]	StAR [*]
GDF9 [†]		TGF-βR11 [*]	17αOH liasa [*]
Kit ligando [¶]			
StAR [¶]			
WT1 [¶]			

Todos los genes fueron localizados mediante hibridación *in situ* en:
[†]Ovocito; [¶]Células de la granulosa; ^{*}Células teca.

4.5.2. Grandes folículos pre-antrales

Aquellos folículos que se desarrollaron para formar grandes folículos preantrales; obtienen múltiples capas de células de la granulosa, una zona pelucida y células de teca interna, con receptores de la hormona luteinizante (LHR) (Cuadro 2; Juengel *et al.*, 2007). En la oveja, un folículo preantral grande contiene 1000-3500 células de la granulosa y el ovocito es de 70-120 μm de diámetro (Figura 6 y 7). Por lo tanto, las células de la granulosa se someten a 7-8 duplicaciones de la población, antes de la formación del antro, y la aparición de los distintos fenotipos de células del cumulus y células murales (McNatty *et al.*, 2007).

4.5.3. Interacciones ovocito y folículo

La ovogénesis y la foliculogénesis están vinculadas con el ovocito en crecimiento y desarrollo (Thibault, 1977). Hyttel *et al.* (1997) menciona que durante el transcurso de la foliculogénesis, los primeros ovocitos adquieren la competencia meiótica, y gradualmente, competencia de su desarrollo, a un estado bioquímico y molecular que permite a un ovocito maduro someterse a la fertilización normal, al apoyo normal a *pre* implantación del desarrollo embrionario y al crecimiento posterior sano del embrión implantado a largo plazo. McNatty *et al.* (2006a) y Scaramuzzi *et al.* (2011) indicaron que el ovulo no es un simple componente en el proceso de la foliculogénesis; y en la oveja se producen al menos dos factores de crecimiento, significado de TGF e IGF, que regulan el desarrollo folicular desde etapas iniciales. El efecto de estos factores en la determinación de la tasa de ovulación es inesperado, por usar especies con altas tasas de ovulación como los ratones, en vez de ser analizadas en ovinos que generalmente tienen una tasa baja de ovulación.

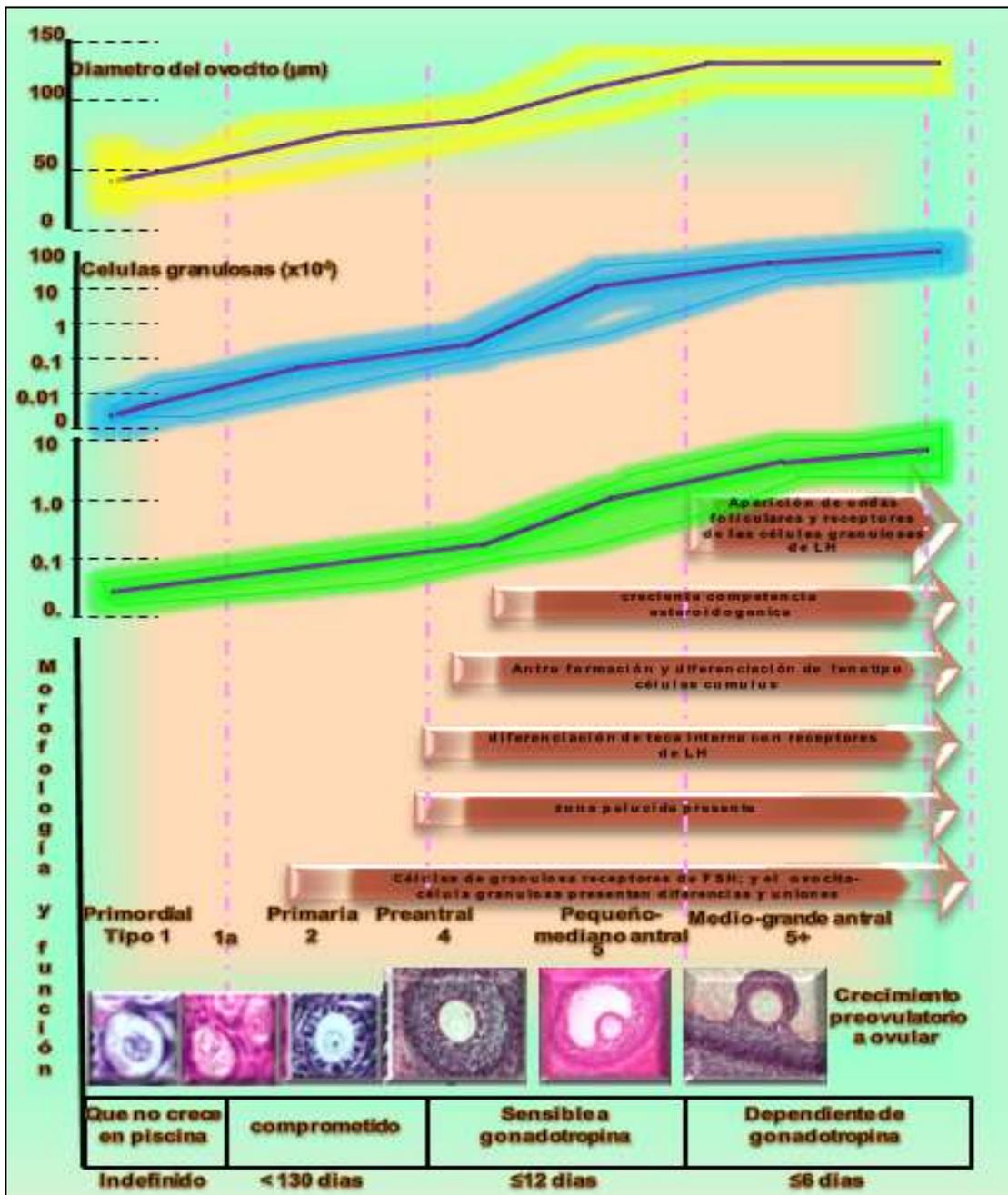


Figura 6. Resumen de foliculogénesis en la oveja. El panel superior muestra la media (línea central y el rango (banda sombreada) líneas de tiempo de crecimiento de los folículos, ovocitos y el número de células de la granulosa, de etapa ovulatoria primordial. El panel inferior muestra la aparición progresiva de varias características críticas funcionales y morfológicas de los folículos que se desarrollan. Las etapas de desarrollo han sido definidos por dos sistemas diferentes: uno basado en la morfología y el otro en las características funcionales de los folículos. Modificado de Lundy *et al* 1999; Scaramuzzi *et al* 2011 y McNatty (datos sin publicar).

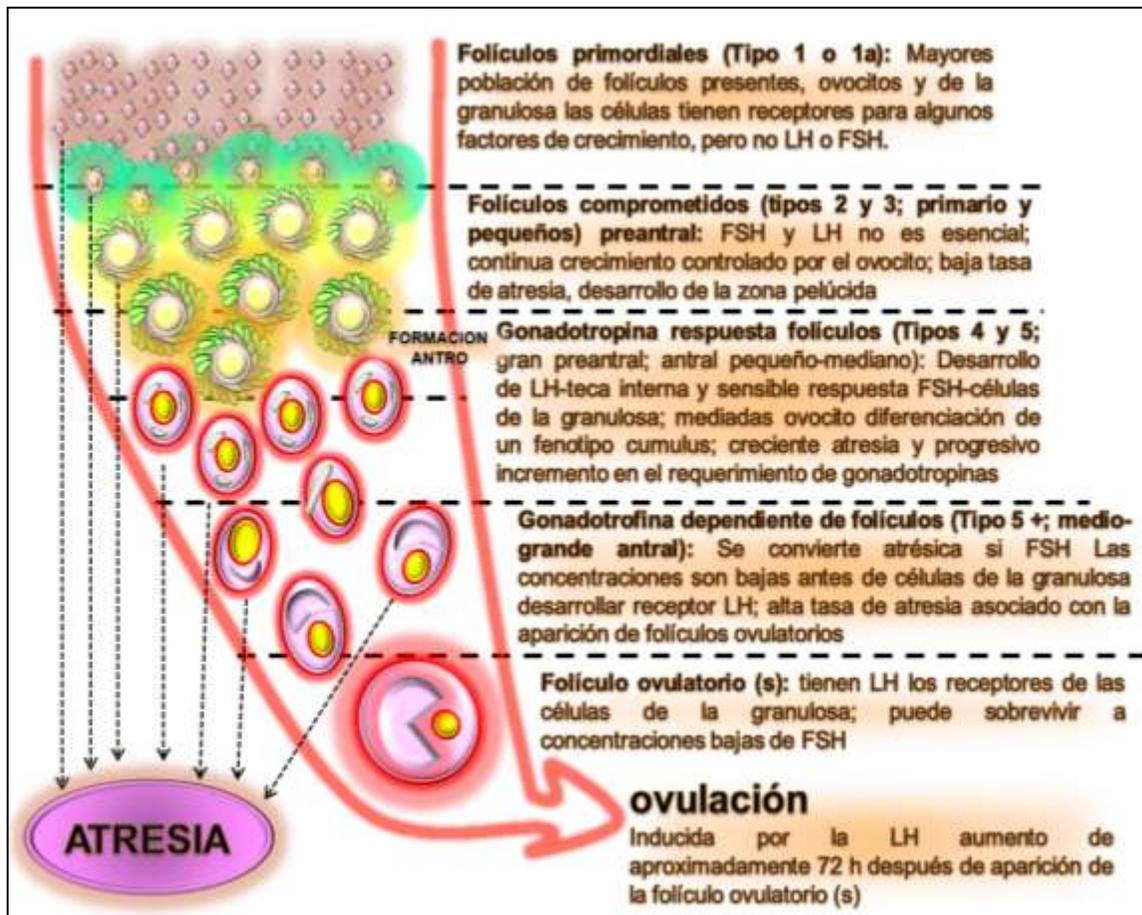


Figura 7. Modelo de foliculogénesis en la oveja. La foliculogénesis se ilustra como un cascada de desarrollo durante el cual los folículos emergen de un grupo de folículos primordiales para iniciar el proceso de crecimiento y desarrollo, que es continua y termina en atresia ó ovulación en la mayoría de los mamíferos rumiantes, Modificado de Scaramuzzi *et al* (1993).

4.5.4. El ovocito como un regulador del desarrollo folicular.

Gilchrist *et al.* (2004) y McNatty *et al.* (2004) indican que el ovocito secreta factores de crecimiento, los cuales participaron centralmente en la regulación de la foliculogénesis, en las células de la granulosa, en la diferenciación del cumulus, en la tasa de ovulación y en el tamaño de la camada (Figura 8).

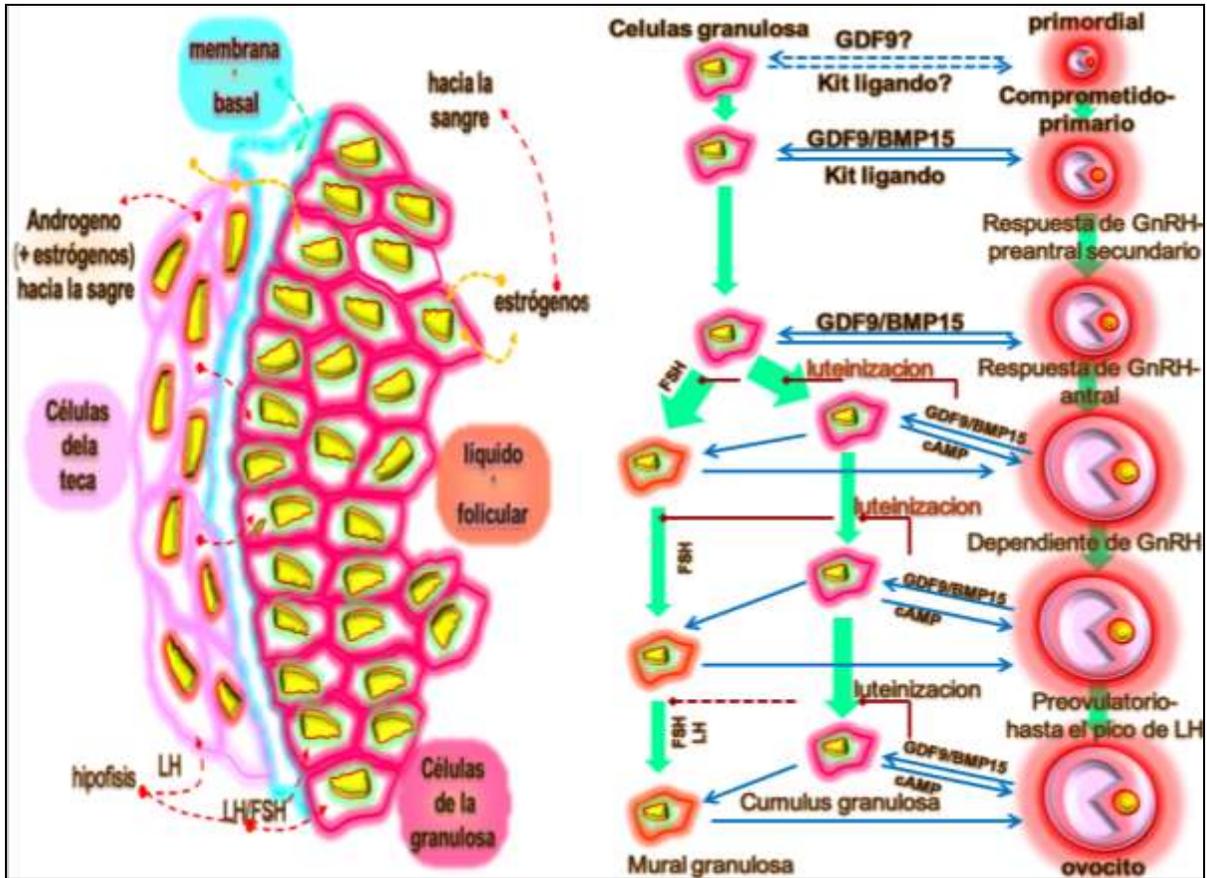


Figura 8. Esquema que ilustra el carácter complejo y altamente integrado de la foliculogénesis involucrando interacciones entre el ovocito y las células granulosa de los folículos en desarrollo, asimismo, indica las vías de diferenciación de la célula de la granulosa (en cumulus y las células del mural de granulosa); además de la función de crecimiento de los ovocitos, adquisición meiótica y competencia de desarrollo; en la formación de antró, ovocitos y células de la granulosa han estado íntimamente asociados y la señal de uno al otro se ha dado a través de uniones gap con factores de crecimiento paracrinos como GDF9, BMP15 y kit ligando; a partir de la formación del antró, un papel crítico de los factores secretados del ovocito (GDF9 y BMP15 principalmente) han sido evitar la luteinización de las células de la granulosa del ovocito vecino con el establecimiento y mantenimiento del fenotipo distintivo de las células del cumulus, durante la fase antral, los factores secretados por los ovocitos también siguen actuando en las células del mural de granulosa para promover la actividad mitogénica y al mismo tiempo inhibir la luteinización; a la vez ambos tipos de células de la granulosa, pero principalmente la del cumulus granulosa proporciona a los ovocitos factores paracrinos, múltiples metabolitos y moléculas reguladoras a través de las mismas uniones gap, ejemplo de ello: el AMP cíclico necesario para que el ovocito adquiera competencia de desarrollo en el folículo. Las flechas discontinuas (azules) señalan las vías donde la evidencia es limitada y las flechas continuas (verdes) gruesas indican un mayor efecto. Modificado de Scaramuzzi *et al.* (1993).

El ovocito secreta factores que regulan varias funciones importantes de las células de la granulosa y del cumulus, incluye la regulación del crecimiento celular, la mejora de la supervivencia y el metabolismo de las células del cumulus. Curiosamente, el ovocito tiene la mayor capacidad para regular muchas de estas funciones durante la fase dependiente de gonadotropina en foliculogénesis, que después de haber completado su fase de crecimiento (Eppig, 2001; Gilchrist *et al.*, 2004; 2008). Eppig *et al.* (1997) y Hussein *et al.* (2005) indican que durante la maduración preovulatoria, FSH y LH impulsan la diferenciación de las células murales de la granulosa hacia un fenotipo luteinizado. Sin embargo, en las células del cumulus, este proceso es inhibido de manera activa por el ovocito, que segrega factores paracrinos. A través de las acciones de los factores de secreción en ovocito, este dirige activamente el linaje de sus vecinas, las células granulosas, hacia el fenotipo de células cumulus (Figura 8). Lo anterior sugiere que el ovocito, con sus requisitos nutricionales y hormonales únicos para su desarrollo, debe regular su microambiente para mantenerlo distinto al resto del folículo (Eppig *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2000; Hussein *et al.*, 2005). Sin embargo, Gilchrist *et al.* (2008) indica que la capacidad de los ovocitos para controlar el desarrollo de las células del cumulus, es probablemente una función crítica en el desarrollo de los ovocitos en general. Dong *et al.* (1996) y Galloway *et al.* (2000) mencionaron que los detalles de la naturaleza molecular, comunicación celular paracrina en los ovocitos, células de la granulosa y células del cumulus, surgieron como factores específicos secretados por los ovocitos, donde se han identificado y caracterizado las vías de señalización en las células de la granulosa y en las células del cumulus. Por consiguiente, queda claro que los dos factores (BMP15 y GDF9) de crecimiento expresados principalmente en ovocitos tienen funciones importantes, indicaron que ambos factores son miembros relacionados estrechamente con la superfamilia del factor de crecimiento y Transformación β (TGF- β) que se producen como *pre* pro proteínas, consisten de un péptido señal, una gran pro región y una región madura. Algo de manera inusual para esta superfamilia, es que ambos factores conservaron un cuarto residuo de cisteína,

requerido para la formación de puentes disulfuro entre las subunidades. Por consiguiente ambos dímeros son no-covalentes; las células de la granulosa y del cumulo expresaron un gran complemento de receptores de células específicas, correceptores y SMADs (proteínas intracelulares que traducen señales extracelulares del factor de crecimiento transformante beta, regulando la expresión de ciertos genes) de la superfamilia TGF- β . La proteína morfogénica ósea del receptor II (BMP-RII) es un receptor crítico para el factor 9 de crecimiento y diferenciación (GDF9) y la proteína 15 morfogénica ósea (BMP15). Cuando GDF9 se une a ella, la activina kinasa 5 (ALK5) se activa y se fosforila a SMAD 2-3. Por consiguiente, SMAD 2-3 se asocia con SMAD4 común y este complejo se transloca al núcleo, donde interactúa con motivos específicos del ADN y reguladores de transcripción que conducen a la transcripción de genes blanco; y cuando se une BMP15 a BMPRII, causa el reclutamiento y la activación de ALK6 (activina kinasa 6, que codifica para el receptor BMP tipo 1B), lo que lleva a la señalización a través de la vía alternativa BMP mediada por SMADs 1,5 y 8 (Shimasaki *et al.*, 2004; Juengel y McNatty, 2005).

4.5.5. Factores derivados de ovocito que afectan la foliculogénesis

En oveja ocurren más de 12 diferentes mutaciones puntuales de origen natural en los genes BMP15, GDF9 y ALK 6 ó FecB^B-BMPR1B-, los cuales influyen en la tasa de ovulación (Scaramuzzi *et al.*, 2011). En mujeres infértiles, mutaciones puntuales se han identificado en la región pro-o madura del gen BMP15. Desde 1991, los estudios de los patrones heredados de la tasa de ovulación en ovino han revelado por lo menos seis mutaciones puntuales en la región pro-o madura del gen BMP15 (McNatty *et al.*, 2006a; Bodin *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2008; Monteagudo *et al.*, 2009). Animales homocigotos para mutaciones de BMP15 tuvieron ovarios disfuncionales y no ovularon. Sin embargo, los heterocigotos tuvieron mayores tasas de ovulación que las hembras del genotipo salvaje; y la mayoría, sino todos estos fenotipos, se han podido reproducir mediante inmunización de ovejas con péptidos constructores de BMP15 ó GDF9. Animales con altos títulos de anticuerpos han conducido a la inmunoneutralización total de

la actividad BMP15 ó GDF9, y han inhibido el crecimiento folicular en las etapas; primaria y primordial. Aunque la inmunización parcial en contra de GDF9, BMP15 o ambos, resultó en una mayor tasa de ovulación y un mayor número de corderos. Bodensteiner *et al.* (1999); McNatty *et al.* (2006a; 2006b) y Juengel *et al.* (2002) reportan que en el ovario de oveja, GDF9 y su RNAm, se ha identificado en ovocitos al momento de la formación de los folículos y en todas las etapas del desarrollo folicular. Por el contrario, en ovinos, BMP15 y su RNAm, se ha identificado en la etapa primaria del desarrollo folicular y en todas las etapas posteriores. La dupla de genes, BMP15 y GDF9, son importantes durante la maduración preovulatoria, porque la inmunización pasiva de ovejas durante la fase folicular del ciclo estral, inhibe la ovulación o la función normal del cuerpo lúteo. Estudio *in vitro* menciona (Scaramuzzi *et al.*, 2011) que BMP15 y GDF9 cooperan en un complejo influyendo en la proliferación y esteroidogénesis en células de granulosa, ya que BMP15 y GDF9 están presentes en el líquido folicular; y que la inmunización interfiere con sus acciones. Por lo tanto, la visión es que estos factores se secretan por el ovocito, y actúan de una manera dependiente de la concentración paracrina adyacente en el cumulus y en las células de la granulosa. En fin, con las concentraciones reducidas de BMP15 y GDF9, se altera ligeramente la capacidad de respuesta de las células de la granulosa a FSH o LH; mientras que la ausencia de BMP15 ó GDF9 impide el crecimiento folicular más allá de las etapas, primordial y primaria. En ovinos, ALK6 (receptor de la proteína morfogenética ósea de tipo IB; a serina / treonina quinasa, implicada en la transducción de señales, codificada por el gen BMPR1B) y su RNAm, se localizaron en los ovocitos de la etapa primordial. En células de la granulosa, ALK6 se ha encontrado en la primer etapa de crecimiento, y posteriormente, en ambos tipos de células durante el desarrollo folicular. A partir de estudios morfológicos, se ha evidenciado que en los folículos de homocigotos mutantes a ALK6, se desarrollaron y ovularon en un diámetro mucho menor y con menos células de la granulosa, que en genotipo salvaje. Las tasas de secreción de inhibina y esteroides en general fueron similares entre los genotipos, mutante y salvaje. Aunque los homocigotos mutantes ovularon de 5-9 folículos en

comparación con 1-2 del genotipo salvaje, una manera de diferenciarlos es observar cuando en las hembras los ovocitos homocigotos mutantes $FecB^B$ alcanzan un diámetro maduro de 130 μm durante la etapa del desarrollo preantral, mientras que los ovocitos del genotipo salvaje no llegan a ese diámetro sino hasta después de la formación del antro. En ovejas portadoras de la mutación $FecB^B$, el ovocito llega a su tamaño completo antes y con menos células de la granulosa, consecuencia de haberse sometido a menos doblajes para alcanzar su tamaño ovulatorio, en comparación con las hembras de genotipo salvaje. Por consiguiente, la capacidad de respuesta más temprana de la gonadotropina que demuestran los tratamientos de inducción de la ovulación múltiple en tasas de ovulación en hembras portadoras de la mutación $FecB^B$, fueron significativamente mayores que en las hembras portadoras de genotipo salvaje mencionado por (Scaramuzzi *et al.*, 2011). Aunque Fabre *et al.* (2003; 2006) indicaron que lo anterior contrasta con ovejas que llevaron mutaciones BMP15 ó GDF9 y, no se supo como la mutación de $FecB^B$ tuvo efectos profundos en la foliculogénesis y en la tasa de ovulación. Sin embargo, menciona Scaramuzzi *et al.* 2011 que en algunos estudios *in vitro* demuestran que la mutación en el receptor ALK6 causa una pérdida de la función con respecto a la función de ligandos BMP; y es posible que explique la mayor capacidad de respuesta a FSH que se ha observado en estudios relacionados.

4.6. Modelo para la regulación de la tasa ovulatoria

Se propuso que las células de la granulosa que rodean la cohorte de folículos reaccionan a la concentración de FSH en plasma, la cual actúa como puerta que regula el paso de la cantidad de folículos a ovular (Baird y McNeilly, 1987). Scaramuzzi *et al.* (2011) menciona que a los ovocitos se les permite ovular en el periodo de tiempo durante una oleada folicular, cuando las concentraciones de FSH se mantuvieron por encima del valor mínimo o umbral exigido por los folículos dependientes de gonadotropina para evitar la atresia. Un periodo de tiempo con el umbral mínimo de FSH permitió solo a un folículo evitar la atresia y si el momento es oportuno continua hasta ovular (Figura 9). Un periodo de tiempo

más largo con el umbral de FSH permitió una ovulación múltiple (Figura 10). Aunque en una puerta de ancho fijo en un pool más grande, puede haber un número mayor de los folículos dependientes de gonadotropina en fase de desarrollo y, estadísticamente son capaces de pasar y ovular (Figura 10). El número de los folículos dependientes a FSH dependen de dos factores principalmente: el primero, una constante determinada genéticamente que no cambia; y segundo, influencias ambientales no genéticas que no son constantes y pueden cambiar, incluso de una oleada folicular a otra. Baird y McNeilly, (1987) y Scaramuzzi *et al.* (2011) manifiestan que hay dos maneras de poder aumentar el número de folículos ovulatorios; la primera, disminuyendo la sensibilidad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario a la retroalimentación negativa para mantener la concentración de FSH por encima del umbral durante más tiempo, lo que permite más tiempo a los folículos desarrollarse (Figura 10). En caso de las razas Romanov y Finnish Landrace en ovinos; y en mujeres, cuando se administran antisuero de E₂ y antiestrogenos, se tiene el mismo efecto. Segunda, aumentar el número de folículos potencialmente ovulatorios disponibles por supresión de la FSH por debajo de su umbral (Figura 11). En el último caso, los niveles de FSH y de los mecanismos de retroalimentación son los mismos en ovinos con ovulaciones múltiples o simples, aunque los folículos son más sensibles a FSH y a desarrollarse precozmente.

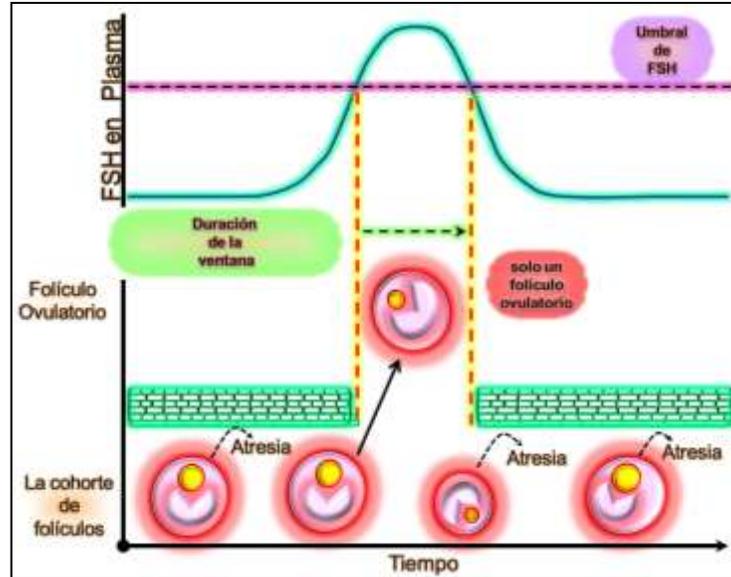


Figura 9. Ancho de la ventana determinado por el periodo de tiempo que las concentraciones de FSH superaron el umbral crítico necesario para prevenir la atresia (parte de un modelo donde se observaron las interacciones que controlaron la tasa de ovulación; para llegar a ovular los miembros de una cohorte de folículos dependientes de gonadotropina necesitaron que sus etapas de desarrollo coincidieran con una ventana de selección). Modificado de Baird y Campbell, (1998).

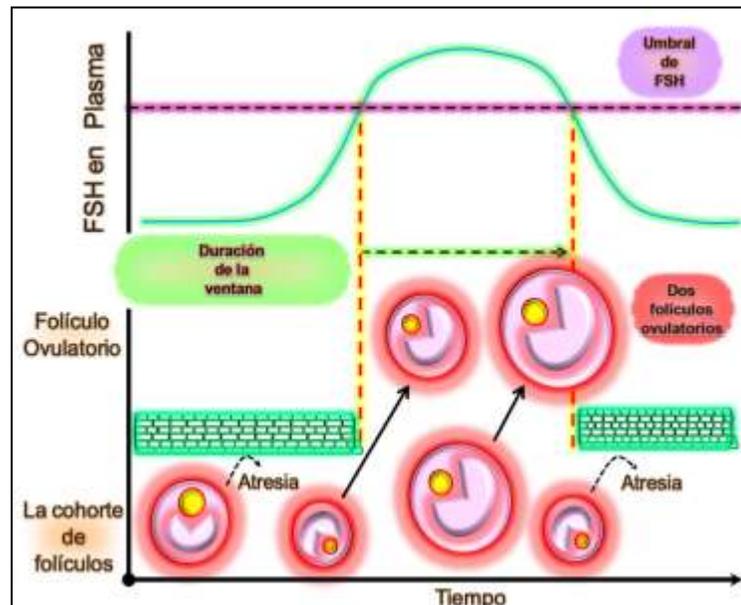


Figura 10. Aumento de la tasa de ovulación mediante el aumento de la anchura de la ventana (parte de un modelo donde se observaron las interacciones que controlaron la tasa de ovulación; para llegar a ovular los miembros de una cohorte de folículos dependientes de gonadotropina necesitaron que sus etapas de desarrollo coincidieran con una ventana de selección). Modificado de Baird, y Campbell (1998).

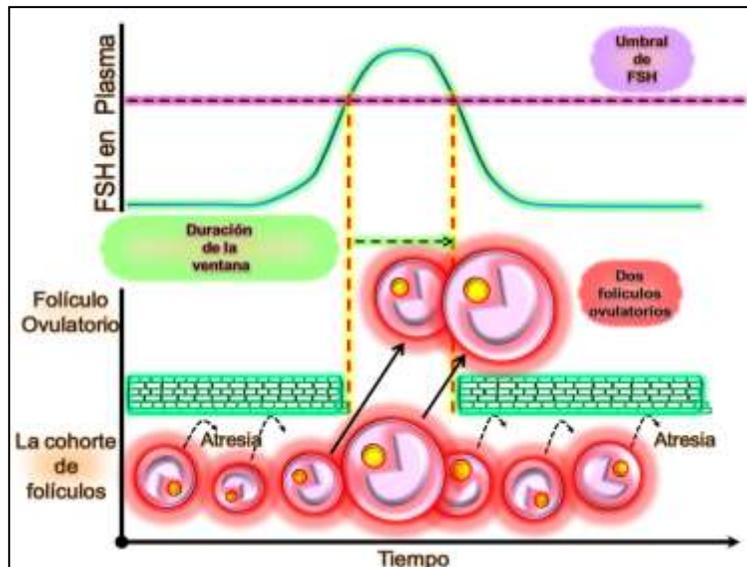


Figura 11. Aumento del número de folículos dependientes de gonadotropina que están listos para pasar a través de la ventana (parte de un modelo donde se observaron las interacciones que controlaron la tasa de ovulación; para llegar a ovular los miembros de una cohorte de folículos dependientes de gonadotropina necesitaron que sus etapas de desarrollo coincidieran con una ventana de selección). Modificado de Baird y Campbell (1998).

4.7. Mejoramiento genético en ovinos

4.7.1. Mejoramiento genético molecular

La utilización de tecnología molecular ha dado lugar al nacimiento de la genómica (Genomics), que pretendió conocer el genoma de las especies animales. Con el descubrimiento de las secuencias simples repetidas (SSR) o microsatélites, han permitido en las especies ganaderas, la elaboración de mapas de ligamiento muy densos; es decir, con distancias muy cortas entre marcadores y la búsqueda de loci de características cuantitativas (QTL's) por todo el genoma, así como aplicar la selección asistida por marcadores. La publicación de estos mapas de ligamiento permitió el descubrimiento de un abundante número de genes individuales que codificaron para caracteres importantes en producción animal, denominados caracteres monogénicos. Los mapas de ligamiento también

permitieron el planteamiento de proyectos en búsqueda de regiones cromosómicas portadoras de genes con influencia en los caracteres cuantitativos, denominados QTL's. Ejemplo de ello fueron los marcadores denominados polimorfismos de un solo nucleótido, SNP (single nucleotide polymorphisms), dialélicos generalmente menos informativo que los microsatelites, pero mucho más frecuente a la mutación y aislados con una frecuencia muy elevada en el genoma de las diferentes especies (St. Primitivo, 2001). La detección de QTL's permitió su utilización prácticamente inmediata mediante la selección asistida por marcadores, pero el objetivo final fue la identificación de las secuencias concretas de ADN responsables del efecto positivo sobre un carácter; es decir, fue necesario identificar concretamente, el gen y el alelo responsable St. Primitivo (2001).

La localización de secuencias de ADN que determinaron efectos fenotípicos muy pequeños, requirió un mayor poder de resolución para la obtención de mapas genéticos y cromosómicos, así como el uso de marcadores de cadena corta y próximos entre sí. La utilización de los distintos marcadores moleculares, han dado lugar a la construcción de mapas genéticos y cromosómicos de secuencias ya identificadas en todas las especies, y disponibles en las bases de datos existentes: Genebank, European Molecular Biology Laboratory, entre otros. Los identificados hasta ahora correspondieron a fenotipos determinados por muy pocos genes, cuando la mayor parte de los caracteres productivos cuantitativos parecen tener una determinación genética poligénica y estar afectados por múltiples efectos ambientales, algunos desconocidos y por importantes interacciones genotipo ambiente. Mientras las técnicas convencionales de mejora únicamente utilizaron la variabilidad genética existente en las poblaciones, la transgénesis pudo incrementar esta variabilidad, utilizando incluso genes de raza o especies distintas, para conseguir un animal a la carta como ya ocurre en vegetales. La producción de animales transgénicos y clonados abre nueva perspectiva en la cría animal. Finalmente, existe otra serie de técnicas como la generación de animales Knock-out carentes de un gen determinado, que han

podido ofrecer importantes aplicaciones para el conocimiento de la función y la expresión génica, así como para el sexado del semen y embriones (St. Primitivo, 2001).

4.7.2. Selección asistida por marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son pequeños fragmentos del ADN que presentan diferencias entre individuos, y estas diferencias a nivel del ADN están también asociadas o son responsables directamente de las diferencias que se observan en individuos (diferencias fenotípicas). Un marcador molecular sirve para marcar un fragmento de ADN; es decir, indica un punto de referencia en el genoma que se hereda y puede ser seguido en las descendencias o generaciones de los animales. La identificación y ubicación en el genoma de estos marcadores, ha permitido la elaboración de mapas genéticos en la mayoría de las especies de animales (Simpson, 1997).

En la actualidad, los marcadores a nivel del ADN más difundidos han sido los Microsatelites (secuencias cortas entre 2 y 6 pares de base repetidas en tándem) y SNP (Single Nucleotide Polymorphisms). Estos marcadores han sido y son la base de los principales estudios que tienen aplicación directa en el campo de la producción agropecuaria. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples, y son de tipo dominante o co-dominante Simpson, (1997). Parker *et al.* (1998) mencionan que el análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs, Restriction Fragment Length Polymorphisms) es el primer marcador de ADN utilizado por biólogos poblacionales. Este método expresa diferencias específicas de ADN que son reconocidas por enzimas de restricción particulares (endonucleasas). Cada una de las endonucleasas (de origen bacteriano), reconoce y corta solamente una secuencia específica de bases nitrogenadas en el ADN, siempre y cuando éstas no estén protegidas (metiladas). Por consiguiente, cualquier ADN no metilado, puede ser reconocido y cortado en fragmentos de longitud definida. Y cualquier mutación dentro de esos sitios, se ha podido cambiar

el patrón del fragmento y ha permitido la detección de un RFLP, al comparar dos o más genomas. Para detectar RFLPs existieron dos técnicas más usadas: Southern Blots (hibridación) y PCR (Valadez y Kahl, 2000).

4.8. Técnicas moleculares en el análisis molecular del ADN

4.8.1. Reacción en cadena de Polimerasa (PCR)

La invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polimerase Chain Reaction) por Mullis y Faloona, (1987) es una técnica *in vitro* utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN, situada entre dos regiones de ADN cuya secuencia se conoce. Antes solo se podía obtener cantidades mínimas de un gen específico, ahora incluso un único ejemplar de un gen puede amplificarse con la PCR hasta un millón de ejemplares en tan solo unas pocas horas (Saiki *et al.*, 1985). Las técnicas de PCR se han hecho indispensables para muchos procedimientos comunes, como la clonación de fragmentos específicos de ADN, la detección e identificación de genes para diagnóstico y medicina legal y en la investigación de modelos de expresión de los genes. Más recientemente, la PCR ha permitido la investigación de nuevos campos, como el control de la autenticidad de los alimentos, la presencia de ADN modificado genéticamente y la contaminación microbiológica.

Los principios de la PCR se basan en el mecanismo de la replicación *in vivo* del ADN: el ADN bicatenario ha sido desenrollado y pasado a ADN monocatenario, duplicado y vuelto a enrollar. Esta técnica consiste en ciclos repetitivos de: a) desnaturalización del ADN por fusión a temperatura elevada, a fin de convertir el ADN bicatenario en ADN monocatenario; b) unión (anillamiento) de dos oligonucleótidos, utilizados como cebadores, al DNA diana; c) extensión de la cadena de ADN por adición de nucleótidos, a partir de los cebadores utilizando DNA polimerasa como catalizador, en presencia de iones Mg^{2+} (Saiki *et al.*, 1985). Sambrook *et al.* (1989) mencionan que los oligonucleótidos consisten normalmente en secuencias relativamente cortas, diferentes entre sí y

complementarias de los sitios de reconocimiento que flanquean el segmento de ADN diana que se ha amplificado. Las fases de desnaturalización del ADN molde, anillamiento del cebador y extensión del cebador, constituyen un «ciclo» del método de amplificación por PCR (Figura 12).

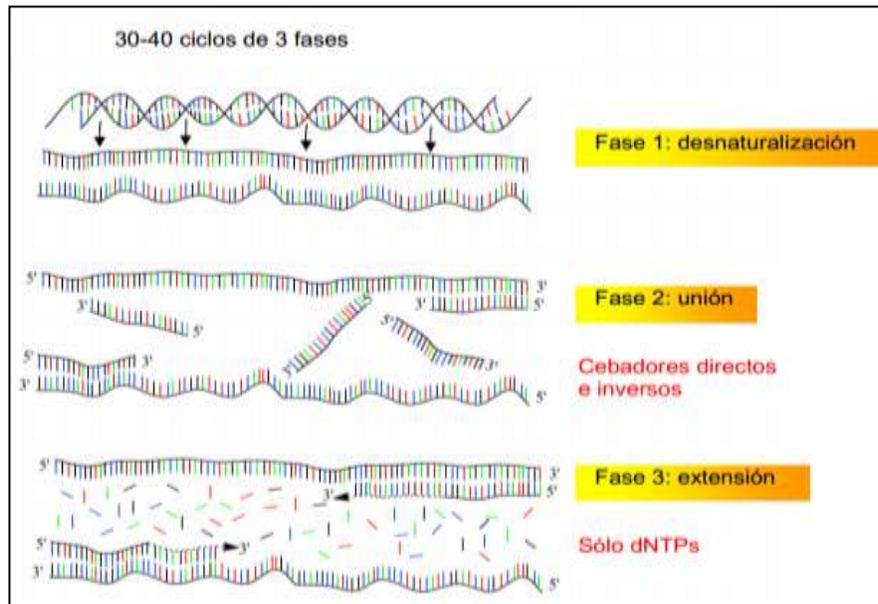


Figura 12. Fases de la amplificación por PCR. Tomado de Vierstraete (1999).

Tras cada ciclo, las hebras de ADN recién sintetizadas sirven de ADN molde para el ciclo siguiente (Figura 13). El producto principal de esta reacción exponencial es un segmento de ADN bicatenario, cuyos extremos vienen definidos por los extremos 5' de los oligonucleótidos cebadores y cuya longitud está dada por la distancia entre los cebadores. Los productos de una primera ronda de amplificación efectiva son moléculas de ADN de diferentes tamaños, cuyas longitudes superan la distancia entre los sitios de unión de los dos cebadores. En la segunda ronda, estas moléculas generan hebras de ADN de longitud definida que se han acumulado de forma exponencial en rondas posteriores de amplificación y constituyen los productos dominantes de la reacción. Así, la amplificación, es el número final de ejemplares de la secuencia diana, expresados en la ecuación $(2^n - 2n) X$: donde n es el número de ciclos, $2n$ el número de

moléculas del primer producto obtenidas tras el primer ciclo y de los segundos productos obtenidos tras el segundo ciclo con longitud indefinida y X el número de ejemplares del ADN molde original. Teóricamente, en 20 ciclos de PCR hay una amplificación de 2^{20} veces, suponiendo que cada ciclo tiene un rendimiento del 100 %.

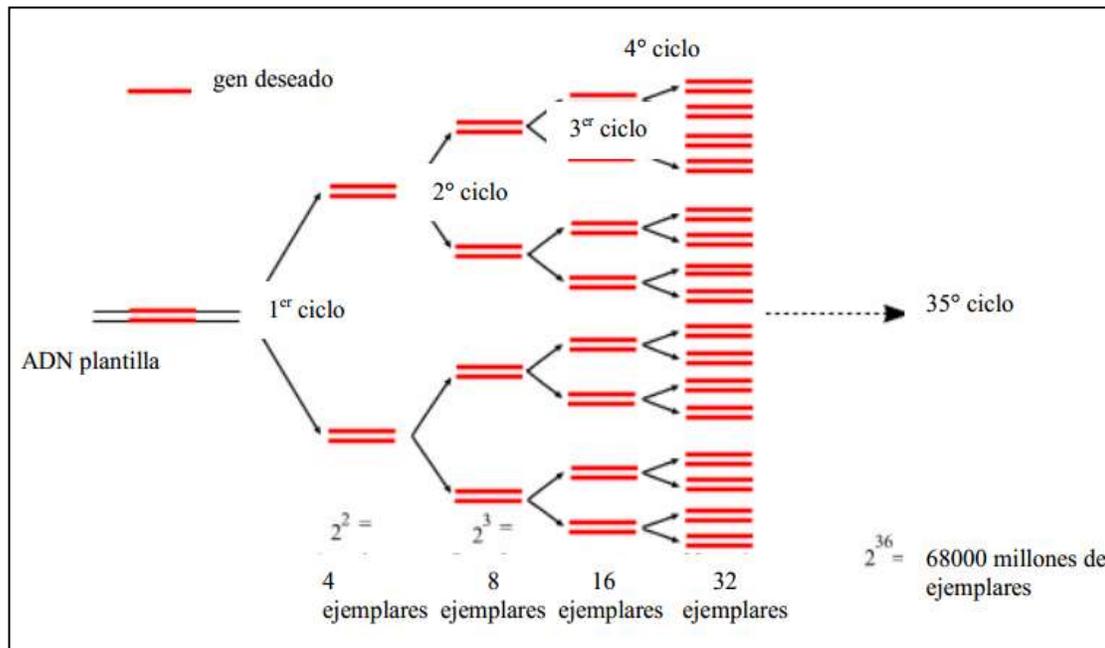


Figura 13. Amplificación exponencial del DNA mediante PCR. Tomado de Vierstraete (1999).

4.8.2. Desnaturalización del ADN molde

Durante la desnaturalización, la hebra doble se funde, abriéndose para originar el ADN monocatenario, y se han detenido todas las reacciones enzimáticas (la extensión de un ciclo anterior), las dos cadenas complementarias se han separado por el aumento de la temperatura, para obtener la desnaturalización del ADN. La temperatura suele aumentar hasta unos 93 – 96 °C. De esta manera, se han roto los fuertes puentes de hidrógeno y aumentado el número de bases desapareadas. La reacción se completa cuando todo el ADN bicatenario se convierte en monocatenario (la temperatura a la que la mitad del ADN bicatenario ha pasado a monocatenario se denomina temperatura de fusión, T_f); el valor de la T_f se puede ver afectado por la concentración de G/C y T/A, la T_f de una

estructura de ADN con una elevada proporción de G/C es más alta que la de un ADN más rico en T/A (Sambrook *et al.*, 1989).

4.8.3. Anillamiento del cebador

La unión o rehibridación de las hebras de ADN se efectúa a una temperatura inferior (generalmente, entre 55 y 65 °C). Una vez que se ha reducido la temperatura, las dos hebras complementarias de ADN monocatenario tienden a formar de nuevo una molécula de ADN bicatenario. En esta fase, los cebadores se mueven libremente y, la formación y la ruptura de puentes de hidrógeno es continua, entre el cebador monocatenario y el ADN molde (monocatenaria). Los enlaces más estables duran un poco más (los cebadores que corresponden exactamente con el ADN molde) y es en ese pequeño fragmento de ADN bicatenario (ADN molde con cebador), donde se fija la polimerasa y empieza a copiar el ADN molde. Cuando se han introducido unas cuantas bases, el enlace iónico entre el ADN molde y el cebador es tan fuerte que ya no se rompe (Sambrook *et al.*, 1989).

4.8.4. Extensión del cebador

En esta fase, los cebadores se extienden a lo largo de la secuencia diana utilizando una ADN polimerasa termoestable (frecuentemente ADN Taq polimerasa) en presencia de dNTP, lo que produce la duplicación del material diana inicial. La temperatura de trabajo ideal para la ADN Taq polimerasa es de 72 °C. Cuando los cebadores se han extendido unas cuantas bases, ejercen una atracción iónica más fuerte sobre el ADN molde, lo que reduce la probabilidad de que se invierta el proceso. Los cebadores que no se corresponden exactamente se vuelven a soltar (debido a la temperatura elevada) y no dan lugar a la extensión del fragmento. Las bases (complementarias del ADN molde) se unen al cebador en el extremo 3' (la polimerasa añade dNTP desde 5' hacia 3', leyendo el ADN molde desde 3' hacia 5'). La duración del tiempo necesario para las fases de extensión del cebador aumenta, si la región de ADN que se amplifica es larga (Sambrook *et al.*, 1989).

4.8.5. Diseño de cebadores para la PCR

El parámetro más crítico para tener éxito con la PCR, es el diseño de los cebadores. Un cebador mal diseñado, puede hacer fracasar una PCR, como resultado de poco producto o incluso ninguno, debido a una amplificación inespecífica o a la formación de dímeros de cebador, lo que ha podido llegar a competir con la formación de producto hasta suprimirla. La secuencia de un cebador determina varios aspectos, como la posición y la longitud del producto, la temperatura de fusión y finalmente, el rendimiento (Innis and Gelfand, 1994; Dieffenbach *et al.*, 1995).

4.8.6. Selección del cebador

Al diseñar cebadores para PCR, se debe tener en cuenta diversas variables. Entre ellas cabe destacar: a) la longitud del cebador, los oligonucleótidos que tuvieron entre 18 y 24 bases presentan una especificidad extrema de secuencia. Siempre que la temperatura de hibridación es óptima, la longitud del cebador también influye en la eficacia de la hibridación, cuanto más largo sea el cebador, menos eficaz será la hibridación, pero tampoco deben ser demasiado cortos. El objetivo debe ser diseñar un cebador con una temperatura de anillamiento de al menos 50 °C; b) la temperatura de fusión (T_f), los dos cebadores oligonucleotídicos deben diseñarse de forma que tengan temperaturas de fusión similares; c) la especificidad del cebador, depende parcialmente de su longitud, los cebadores han de elegirse de forma que tengan una secuencia única dentro del ADN molde que debe amplificarse. Los mejores resultados se obtiene con una temperatura de fusión de 55 a 72 °C (longitud 18 y 24 bases); d) las secuencias complementarias del cebador, es absolutamente necesario que el diseño de los cebadores no incluya ninguna homología interna del cebador de más de 3 pares de bases, dado que puede interferir con la hibridación al ADN molde (Dieffenbach *et al.*, 1995).

4.9. Sistema de Amplificación Refractario de Mutaciones (Tetra primer ARMS- PCR)

Una de las técnicas más empleadas para la detección de mutaciones es RFLP. Sin embargo, es un proceso relativamente lento y solo permite la detección de un número limitado de mutaciones. Además, cuando se usa enzimas de restricción, eleva su costo. Por otra parte, la técnica de tetra primer ARMS-PCR permite la detección de cualquier mutación puntual. Esta técnica es un método relativamente económico para polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), ya que el genotipo involucra una sola reacción de PCR, seguida de una electroforesis en gel (técnica específica de alelo genotipo PCR que hace el uso de dos conjuntos de cebadores designados, cebadores externos e internos). Los cebadores externos son constantes, mientras que los cebadores internos son alelo específico (un desajuste deliberado es incluido en la posición -3 de los cebadores alelo internas, específicas para aumentar la especificidad). La falta de coincidencia en el interior de los cebadores, son diseñados sobre la base de la regla siguiente: los “fuertes desajustes” (G por A ó C por T) en el extremo 3' de un cebador específico de alelo requiere un segundo "desajuste débil" (C por A o G por T) y viceversa. Mientras que un desajuste medio (A por A, C por C, G / G o T por T) en el extremo 3' requiere un segundo “desajuste medio” (Figura 14; Ye, 2001; Chen *et al.*, 2007).

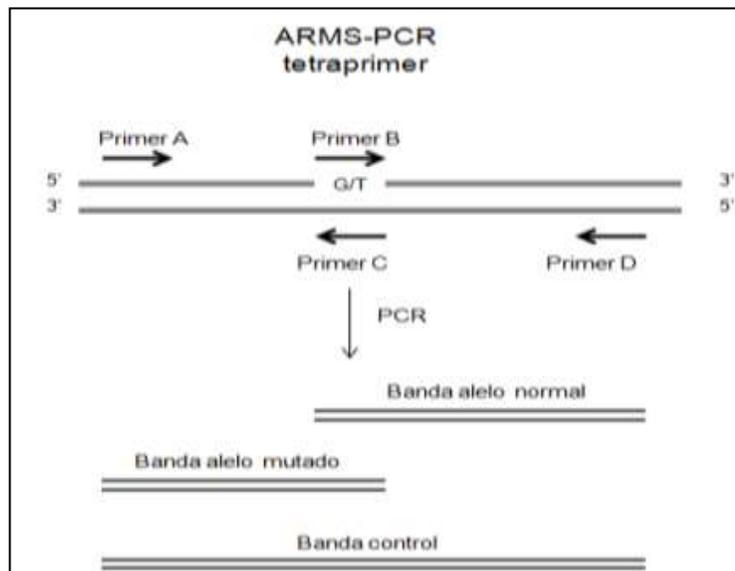


Figura 14. Fundamento de tetraprimero ARMS-PCR. Tomado de Zenteno (2009).

Esta técnica cuenta con cinco ventajas: 1) es un método relativamente sencillo y rápido; 2) no requiere de equipo especial, sólo termocicladores para PCR; 3) distingue entre homocigotos y heterocigotos para un locus específico; 4) no requiere digestión ni secuenciación posterior a la reacción; y 5) las mezclas de reacción se pueden analizar inmediatamente después del término de la amplificación mediante gel de poliacrilamida o agarosa (Newton *et al.*, 1989; Ye *et al.* 2001; Gupta and Sehajpal , 2003; Chen *et al.*, 2007;). Esta técnica requiere del diseño y construcción de un oligonucleótido, alelo específicos, a los cuales se les añadió intencionalmente una mutación en los primeros nucleótidos del extremo 3', para crear "mismatches", que constituyen desajustes o errores de apareamiento entre bases no complementarias de Watson y Crick (Rolfs *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2001; Karhukorpi *et al.*, 2001; Gupta and Sehajpal , 2003). El procedimiento del método consiste en preparar un mezcla de reacción con cuatro oligonucleótidos, con la cual se obtienen tres productos de amplificación (mutado, silvestre y control) para heterocigotos y, sólo dos productos para homocigotos (mutado ó silvestre y control). Sin embargo, debido a que la mezcla de los cebadores, que generalmente se colocaron en el mismo microtubo, la sensibilidad de tetra primer-ARMS, puede resultar baja por la competencia de reacciones de PCR dentro del microtubo (Ye *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007).

4.10. Genes candidatos de fecundidad

La acción de determinados genes mayores (genes candidatos) tiene un gran efecto sobre la tasa de ovulación (Lahoz *et al.*, 2011; Scaramuzzi *et al.*, 2011). En la especie ovina, se han descrito a 8 fenotipos con mayor tasa de ovulación y prolificidad en diferentes razas asociados a genes mayores (Cuadro 3). Según Lahoz *et al.* (2011), reporta que la mayor parte se asocia a mutaciones localizadas en dos genes relacionados con la superfamilia del factor beta de crecimiento transformador (TGF- β , Transforming Growth Factor β): 1) la proteína 15 morfogénica ósea (BMP15, Bone Morphogenetic Protein 15 ó FecX), la cual se encuentra en el cromosoma X, más sus seis mutaciones diferentes; 2) el factor 9 de diferenciación de crecimiento (GDF9, Growth Differentiation Factor 9 ó FecG),

una mutación en el cromosoma 5; y el receptor 1B de la Proteína Morfogénica Ósea (BMPR-1B), también conocido como FecB, que codifica el receptor BMP tipo 1B o activina kinasa 6 (ALK6), en el cromosoma 6 (mutación Booroola). En los otros dos fenotipos sólo se ha establecido la localización de las mutaciones responsables en los cromosomas X y 11, pero no se han encontrado cual fue el gen mutado, y en los cuatro fenotipos restantes ni siquiera se ha localizado el cromosoma en el que se encuentran dichas mutaciones. Con estudios anteriores, se infiere que el sistema BMP en el cual intervienen los genes (BMP15, GDF9 y BMPR1B) desempeña un papel fundamental en la foliculogénesis, modulando la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y de la teca, en respuesta a la estimulación por gonadotropinas, produciendo un gran número de variaciones a nivel intrafolicular. Esta mutación induce una maduración precoz de los folículos ováricos, al incrementar su sensibilidad a la FSH, y no por un incremento de la concentración de la FSH circulante. Las ovejas portadoras de la mutación producen una ovulación y luteinización de numerosos folículos maduros de menor tamaño con una sensibilidad precoz a LH, lo que conduce a una tasa mayor de ovulación (Davis *et al.*, 1991, 1992; Galloway *et al.*, 2002; Hanrahan *et al.*, 2004; Davis, 2005; Davis *et al.*, 2006; Bodin *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2006; Notter, 2008; Jurado *et al.*, 2008; Lahoz *et al.*, 2009a, 2009b; Forgarty, 2009; Polley *et al.*, 2009; Lahoz *et al.*, 2011).

Cuadro 3. Fenotipos descritos en ovinos con sus respectivos efectos sobre la tasa de ovulación y la prolificidad. Tomado de Davis (2005); Davis *et al.*, (2006); Bodin *et al.*, (2007); Chu *et al.*, (2006); Notter (2008); Jurado *et al.*, (2008); Lahoz *et al.*, (2009a, 2009b) y Forgarty (2009).

Gen	Nombre del fenotipo	Alelo	Cromo soma	Efecto sobre tasa de ovulación y prolificidad	Raza
BMPR-1B	Booroola	FecB ^B	6	B+: ♠+1.3; ♥+0.7 [†]	Merino Garole, Javanese, Huyang, Small Tailed Han, Cele, Duolang, Chinese Merino
BMP15	Inverdale	FecX ^I	X	I+: ♠+1.0; ♥+0.6 II: Estéril (ovarios hipoplásicos)	Romney
BMP15	Hanna	FecX ^H	X	H+: ♠+1.0; ♥+0.6 HH: Estéril (ovarios hipoplásico)	Romney
BMP15	Belclare	FecX ^B	X	B+: ♠+0.7 BB: Estéril (ovarios hipoplásicos)	Belclare
BMP15	Galway	FecX ^G	X	G+: ♠+0.7 GG: Estéril (ovarios hipoplásicos)	Belclare, Cambridge
BMP15	Lacaune	FecX ^L	X	G+: ♥+0.55 L+: ♠+1.5 LL: Esteril (ovarios hipoplásicos)	Small Tailed Han Lacaune
BMP15	ROA	FecX ^R	X	R+: ♠+0.63; ♥+0.32 RR: Estéril (ovarios hipoplásicos)	Rasa Aragonesa
GDF9	High Fertility	FecG ^H	5	H: ♠+ 1.4 HH: Estéril (ovarios hipoplásicos)	Belclare, Cambridge

[†]Small Tailed Han: Prolificidad B+: +1.1; BB: +1.4; ♠ Tasa de ovulación; ♥ Prolificidad

4.11. La Proteína 15 Morfogénica Ósea (BMP15)

La proteína 15 morfogénica ósea (BMP15) también conocida factor 9B de crecimiento y diferenciación (GDF9B ó FecX), es miembro de la superfamilia de factor beta de crecimiento transformador (TGF β), expresado exclusivamente en el ovocito, en ovejas y otras especies como el ratón; relacionado estrechamente con el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9 ó FecG), dentro del ovocito. Los dos son muy específicos de la superfamilia TGF β y esenciales para la foliculogénesis ovárica temprana. Las ovejas que son heterocigotas han mostrado un incremento en la tasa de ovulación, mientras que las que son homocigotas son infértiles. Sin embargo, el receptor de las células de la granulosa que media la respuesta de BMP15 aun no ha sido identificado, pero si el descubrimiento de que una mutación en el receptor BMP15 en oveja Booroola es responsable del aumento en la tasa de ovulación; es decir, influye sobre la moléculas de señalización TGF β en la foliculogénesis temprana. El efecto del gen BMPR-1B también conocido como FecB, codifica el receptor BMP tipo 1B o activina kinasa 6 (ALK6), es evidente un incremento en la tasa de ovulación (McNatty *et al.*, 2006a, 2006b).

Galloway *et al.* (2002) reportan que BMP15 y GDF9 son factores de crecimiento secretados por el ovocito, que regulan el crecimiento y la diferenciación de la profase en el folículo ovárico. El gen BMP15 se ubica en el cromosoma X. La secuencia completa de codificación es de 1179 nucleótidos contenidos en dos exones, separados por un intrón de aproximadamente 5.4 Kb y codifica una prepropéptido de 393 residuos de aminoácidos. El péptido maduro activo es de 125 aminoácidos de longitud. El GDF9 se ubica en la oveja al cromosoma 5 (Sadighi *et al.*, 2002), el gen con alrededor de 2.5 Kb, contiene dos exones separados por un único intrón de 1126 pb y codifica una prepropéptido de 453 residuos de aminoácidos. El péptido maduro activo es de 135 aminoácidos de longitud (Bodensteiner *et al.*, 1999). Hongcai *et al.* (2010) indica que una mutación en el sitio de GDF9 afecta significativamente el tamaño de la camada en

la oveja. En fin, los efectos de BMP15 y GDF9 aumentan el tamaño de la camada en ovejas heterocigotas y la infertilidad en homocigotas (mutantes).

4.11.1. La Proteína 15 Morfogénica Ósea (BMP15) y su función en el ovario

Las mutaciones en el gen BMP15 ó GDF9B están asociadas con la infertilidad y la tasa de ovulación mayor entre las razas de ovejas Inverdale y Hanna (Galloway *et al.*, 2000). El gen Inverdale de alta fecundidad (FecX^I), por su importancia en la prolificidad, se identificó por primera vez en los descendientes de una oveja de Romney, con un tamaño de camada consistentemente alto. Los estudios de segregación demostraron que el gen se ubica en el cromosoma X (Davis *et al.*, 1991). En ovejas, una sola copia del gen en heterocigotos (I+) incrementa la tasa de ovulación en alrededor de un ovocito extra, y el tamaño de la camada de alrededor de 0.6 corderos. Sin embargo, en ovejas homocigotas (II) con dos copias del gen tienen ovarios pequeños, no funcionales e infértiles (Davis *et al.*, 1992). En una segunda familia de ovejas Romney (Hanna, FecX^H) que no guarda relación con Inverdale, presentan también el mismo fenotipo ligado al cromosoma X, con FecX^I alélica. Las tasas de ovulación y tamaño de las crías (en portadores heterocigotos) y la infertilidad (homocigotos portadores) son idénticos en la dos familias (Davis *et al.*, 2001). Aparte de la disminución de la tasa ovulación en homocigotos (II), muestran una grave interrupción de la función normal ovárica, aun siendo similar en apariencia a los heterocigotos (I+).

Los niveles circulantes de FSH y LH en ovejas homocigotas son similares al de las ovejas ovariectomizadas (ovejas sin gónadas) y no se detecta E₂ o la inhibina (Shackell *et al.*, 1993). En el examen histológico de ovarios de hembras adultas homocigotas (II) revela que no hay folículos normales desarrollándose más allá de la etapa primaria (Braw-Tal *et al.*, 1993) y la detección similar de desarrollo del folículo se observa en las muestras de ovarios fetales (Smith *et al.*, 1997). En los ovarios de la oveja homocigota (II), el ovocito se observa sin folículos (Braw-Tal *et al.*, 1993), y algunas ovejas homocigotas (II) contienen también anomalías

como tumores, las estructuras, a menudo visibles de la superficie del ovario, y secretan biológicamente activos de inhibina (Brawn-Tal *et al.*, 1993; McLeod *et al.*, 1995).

El mapeo genético (genetic linkage map) fue utilizado por primera vez para construir un mapa de ligamiento genético del cromosoma X de ovejas (Galloway *et al.*, 1996). Lo anterior, más el diagnóstico por laparoscopia, identifican que las hembras homocigotas (II) presentan ovarios no funcionales. En la recombinación de los pares de cromosomas durante la meiosis, se observa el intercambio de material genético entre los pares de cromosomas en cada generación, resultando más propensos pasar juntos en el mismo fragmento del cromosoma, mientras que dos genes más separados son más propensos a ser recombinados y de transmisión por separado. La frecuencia con que las copias individuales de los genes se heredan de un gran número de descendientes, proporciona una medida de la recombinación y, por lo tanto, la distancia entre los genes. Los cromosomas X de los mamíferos placentarios son en gran parte limitado por la regla de Ohno, que postula que los genes en el cromosoma X de un mamífero, se encuentran también en los cromosomas X de todos los demás mamíferos (Ohno, 1973). Esta conservación de genes está relacionada con el requisito de inactivación del cromosoma X en las hembras (XX) de compensación de la dosis, en comparación con los varones (XY) (Galloway, 2002).

4.11.2.Función del gen BMP15 en el índice de prolificidad.

La prolificidad es uno de los caracteres más ligados con la mejor aptitud de producción probable (MAPP o MPPA, Most Probable Producing Ability), aun que tiene la heredabilidad más baja y por lo tanto, son más difíciles de mejorar por selección (Falconer, 1971). Laviña (2012) menciona que uno de los aspectos genéticos de la prolificidad ovina, es determinar la aproximación de la heredabilidad, y la prolificidad ovina es, precisamente, un carácter de baja heredabilidad. Tal caracter de la prolificidad tiene su expresión fenotípica en una escala categórica, no continua; es decir, la prolificidad de una oveja es un parto determinado con valores de 1, 2 ó 3 corderos nacidos, siendo además desigual

la incidencia de cada categoría. Por tanto, se trata de un carácter cuya manifestación aporta menor información acerca de las causas determinantes, ambientales y genéticas, que un carácter continuo.

Por lo anterior, Altarriba *et al.* (2001) mencionan que se dificulta el análisis genético de los datos y explica el hecho, que tanto el desarrollo metodológico de la genética cuantitativa como su aplicación a la mejora animal, tenga mayores dificultades. Las estimaciones realizadas por Rojas y Rodríguez (1995) han proporcionado el único valor de 0.15 para la heredabilidad de la prolificidad en la raza de pelo. Sin embargo, aun falta estimar este índice en la raza Pelibuey.

Un estudio realizado por Laviña *et al.* (2009) con la asociación del tipo de parto, donde se favorece la prolificidad con el gen BMP15, muestra cómo influye uno de los polimorfismos (FecX^R) del gen BMP15 en la raza Aragonesa, con efecto en el tipo de parto y variación en la prolificidad, presentando una mayor frecuencia de partos triples en el caso de mutantes, en el cual los porcentajes de partos triples o más aumentaron. Los datos tomados en tres explotaciones muestran al genotipo mutante con valores de 39.1 %, 13.2 % y 23.3 % en el porcentaje de partos triples, en comparación con los valores de 1.6 %, 2.4 % y 22 % para el genotipo salvaje.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En la actualidad, la producción de los ovinos se enfoca al consumo de su carne. En cuanto al mercado de la carne, generalmente está asociado a poblaciones grandes que tienen el hábito de consumir carne de ovino en alguna de sus formas. La parte central del país es la de mayor consumo, preferentemente como barbacoa. En esta zona, tanto el precio del cordero en pie, como el transformado en barbacoa son buenos, tampoco se descarta el consumo de carne ovina en otras formas y mercados diferentes a los tradicionales. La gran variedad de más de veinte razas de ovinos que conforman los rebaños mexicanos, de los cuales, las razas puras se encontraron en los extremos de las condiciones agroclimáticas

con diferentes aptitudes, y en los intermedios las cruza. SAGARPA (2011) y SIAP (2011) reportan que la raza en la producción de corderos que más se ha utilizado en la parte terminal han sido las razas paternas conocidas por su mayor peso, como ejemplo el Kathadin. Sin embargo, la base e inicio de la mayoría de la producción ovina han sido con razas conocidas como razas maternas, entre los que encontramos al Pelibuey en la mayoría de los hatos. Perón (2008) reportó que la raza Pelibuey ha tenido una alta adaptación, buen comportamiento reproductivo y alta supervivencia en relación con otras razas de ovinos. Además, una alta capacidad al seleccionar alimentos, un fácil manejo, canales pequeñas de fácil almacenaje y bajo gasto para iniciar este tipo de producción.

Actualmente, el productor ovino está interesado en realizar mejoramiento genético en su rebaño a un nivel competitivo en el ámbito nacional e inclusive internacional, situación por la cual se ve obligado a hacer uso de herramientas tecnológicas y para ello, es necesario contar con un sistema sencillo de concentración de parámetros, por medio del cual pueda obtener y registrar la información mínima para lograr un mejoramiento o avance genético en su rebaño. Debido a que en los últimos años, los precios elevados para comprar alimentos del ganado, los precios bajos que el productor percibe de los intermediarios, el bajo consumo de carne en las regiones más aisladas de las ciudades, la falta de relevo generacional, los continuos cambios de la política agraria y los problemas sanitarios, obligan al productor aumentar la competitividad de la producción con mejoramiento genético y, una de las opciones que tuvo el ganadero es aumentar la prolificidad (Lahoz *et al.*, 2011).

El mejoramiento genético inicia con los procedimientos estadísticos, los cuales, requieren de información relacionada con la identificación de cada animal, de su genealogía y su raza, así como otras mediciones de los variables productivas y reproductivas (prolificidad) bajo evaluación, con sus respectivas fechas. Un aspecto fundamental en el registro de información es la precisión de los datos. Un error en la identificación de un animal, en una fecha, en una medición, dar

información equivocada acerca de un animal o del rebaño en general, entre otras cosas, reduce la confiabilidad de ese registro.

Los registros de prolificidad y genealogía del rebaño respaldan correctamente la evaluación que precisa la selección genética de los animales en la estimación de genes relacionados con la prolificidad. Galloway *et al.* (2000); Lahoz *et al.* (2011) y Scaramuzzi *et al.* (2011) reportan que el gen de la proteína 15 morfogénica ósea (BMP15), también conocida factor 9B de crecimiento y diferenciación (GDF9B ó FecX), es miembro de la superfamilia de factor de crecimiento transformante beta (TGF β), y es uno de los 14 fenotipos de la especie ovina, que se han descrito en los análisis moleculares por tener una mayor tasa de ovulación y prolificidad en diferentes razas. Simpson, (1997) indicó que los análisis con marcadores moleculares, tienen una función de marcar un fragmento de ADN; es decir, indicar un punto de referencia en el genoma que se hereda y puede ser seguido en las descendencias o generaciones de los animales. Estos marcadores son la base de los principales estudios que tienen directa aplicación en la producción agropecuaria. Por lo tanto, es necesario fortalecer al sistema producto ovino considerando los registros de variables reproductivas y productivas, para implementar un programa de mejoramiento genético en ovinos productores de carne que puedan medirse, con influencia económicamente importante y efecto directo sobre las utilidades del ganadero, como el gen BMP15 y sus polimorfismos relacionados con prolificidad.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1.Ubicación del estudio

El estudio se realizó con datos de registros provenientes de ovejas del Rancho “El Tesoro”, ubicado en el km. 19.3 de la ciudad de Campeche, Campeche, rumbo hacia Edzna; ubicado geográficamente a 19° 35' LN y 90° 20' LO, a un altitud de 15 m. La temperatura y precipitación promedio anual es de 26 °C y 1,138 mm, respectivamente. Para la alimentación de los ovinos, el rancho cuenta con 42 ha de pradera establecidas, de las cuales 22 ha tienen sistema de riego por aspersión con especies de pasto como Pará, estrella, Tanzania y Johnson,

aptas para pastoreo; además de insumos como el maíz, sorgo y soya, de acuerdo a la temporada y oportunidad. La infraestructura de la producción son dos naves para albergue de los animales de 15 x 90 m. de circunferencia, con un techo de láminas de zinc de 12 x 9 metros. En las cuales se ubican los corrales, con bebederos móviles y comederos de concreto. Se cuenta también una bodega de aproximadamente 140 m² para almacenamiento de insumos (Figura 15).



Figura 15. Ubicación del rancho “El Tesoro”, Campeche, Campeche.

6.2. Mejor aptitud probable de producción MPPA (prolificidad)

La mejor aptitud de producción probable (MAPP o MPPA, Most Probable Producing Ability), se usó como estimación futura de la prolificidad de los ovinos en relación al tamaño de la camada y al número de camadas de la observación individual, comparadas con las del rebaño seleccionado basada en su productividad pasada, mencionado por Lush (1945) y Herrera *et al.* (2003).

La estimación de MPPA de prolificidad se realizó con la siguiente ecuación:

$$\text{MPPA: } \bar{H} - b_{y,x} (\bar{X} - \bar{H})$$

Despejada la ecuación:

$$\text{MPPA: } \bar{H} - \frac{nr}{1+(n-1)r} (\bar{X} - \bar{H})$$

Donde:

\bar{H} = promedio de la producción (prolificidad) del rebaño.

\bar{X} = promedio de producción (prolificidad) del individuo.

N = número de registros de producción del individuo x .

r = repetibilidad de la característica.

$b_{y,x}$ = coeficiente de regresión de la producción futura sobre el presente.

Las variables de la ecuación tuvieron que ser adaptadas al software SAS (Sistema de Análisis Estadístico; SAS[®]) en dos programas diferentes:

- 1) prol1, obtuvo el número de la camada y tamaño de la camada por observación, a la vez que, el número de camadas y el tamaño de las camadas del rebaño (Anexo 1),
- 2) MPPA prol, ajustó la prolificidad del rebaño y obtuvo la prolificidad heredable, indicando cuales fueron las más prolíficas y las menos prolíficas (Anexo 2).

Con los datos de los registros del rebaño con la variable reproductiva prolificidad, se obtuvo información sobre la identificación de la madre, año en que nació, número de la camada y tamaño de la camada, de diez partos por ovejas y, obtener el índice de los animales más prolíficos comparados con los del rebaño de acuerdo a su heredabilidad en diez partos anteriores a la toma de los datos, para evaluar el gen BMP15, por medio del análisis de la mejor aptitud de producción probable (MAPP o MPPA, Most Probable Producing Ability). Lo anterior sirvió para seleccionar a los animales para la colecta de las muestras.

6.3. Características de los animales experimentales

Las muestras de sangre se obtuvieron de hembras para pie de cría de 8 meses de edad hasta 10 años 9 meses de edad que presentaron las mejores características fenotípicas y genéticas de la raza Pelibuey, avaladas mediante un registro que expide la AMCO (Asociación Mexicana de Criadores de Ovinos), cuyo uso es la producción y pie de cría (nivel regional y nacional en paquetes de pequeños rebaños) (Figura 16) y de acuerdo al análisis de mejor aptitud de producción probable (MAPP) en prolificidad (Figura 17).



Figura 16. Grupo de ovejas de la raza Pelibuey.

6.4. Colecta y conservación de muestras

Muestras sanguíneas de 253 ovejas se colectaron de la vena yugular en los meses de diciembre de 2011 y marzo de 2012. Se utilizaron tubos vacutainer de tapa lila (VACUTAINER HEMOGAR; HEMOGAR[®]) con anticoagulante K2 EDTA para muestras de plasma y análisis de hematología en recuento plaquetario (Figura 17). Enseguida de la toma sanguínea, el tubo se giró a 180° mediante un movimiento suave para hacer la mezcla homogénea sin deteriorar los glóbulos rojos. Posteriormente, los tubos se almacenaron a 4 °C hasta su transportación al

Laboratorio de Fisiología Vegetal del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México.



Figura 17. Colecta de muestras sanguíneas de acuerdo a los registros de la mejor aptitud de producción probable (MPPA) en prolificidad.

6.5. Preparación de la muestra para PCR

Para la identificación de los polimorfismos del gen BMP15, se realizó la extracción de ADN de las 253 muestras sanguíneas, mediante las instrucciones del kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAamp[®]DNA Blood Mini Kit catalogo 51106 y catalogo 51104; QIAGEN[®]).

Para la búsqueda de los exones 1 y 2, se realizó la extracción de ADN en 5 muestras de ovejas prolíficas y 5 no prolíficas según el análisis de aptitud (MPPA), con la metodología descrita por Reineke *et al.* (1998) y Moller *et al.* (1992), de acuerdo con las siguientes modificaciones: Se colocaron 200 μ L de sangre con anticoagulante EDTA en tubos Eppendorf de 1.5 mL; a cada tubo se le añadió 200 μ L de nitrógeno líquido. Inmediatamente, se ocasiono lisis con el uso de la homogenizadora de tejido (Modelo 6-105 AF; VIRTIS "23" [®]) durante 15 segundos. Después de la primer ronda en la homogeneizadora, distribuidos en dos rondas más, se agregaron 500 μ L del buffer de extracción (Tris 0,1 M, pH 8,0, EDTA 10 mM, 2 % SDS, 0,2 mg mL⁻¹ de proteinasa K). Inmediatamente de la

tercer y última ronda, cada muestra se incubó durante 1 hora a 58 °C en baño María, mezclando suavemente con un giro de 180° cada diez minutos. Posteriormente, se añadieron 140 µL de NaCl a 5 M (a una concentración final de 1.4 M) y a la vez, se agregó un volumen de 1/10 aproximadamente del CTAB al 10 %, volviendo a mezclar con un movimiento suave. Enseguida, se incubó 1 hora a 65 °C e inmediatamente de ese tiempo, a la muestra se le agregó V/V (volumen a volumen) de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1). Antes de continuar, se volvió a mezclar suavemente con la mano para proseguir con la centrifugación (EBA 21; Hettich[®]) a 13K por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrifuga nuevo, al cual se le añadieron 250 µL de NH₄Ac (acetato de amonio 4M pH = 7.5) a 5M, mezclando suavemente y colocado en hielo por 30 minutos. El sobrenadante resultante, se transfirió a un tubo nuevo de microcentrifuga, al cual se añadieron 550 µL de Isopropanol frío, mezclando suavemente y colocado en hielo por 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 13K por 15 minutos; el sobrenadante se desechó para lavar el pellet con 1 mL de etanol (Et-OH 70 %) frío y se realizó una última centrifugación a 13K por 5 minutos. Por último, se desechó el etanol y se recuperó el pellet, previo secado a temperatura ambiente. Una vez recuperado y secado el pellet, este fue resuspendido en 40 µL de agua estéril (agua inyectable; PiSA[®]) para su uso posterior en la reacción de cadena de polimerasa (PCR). Para la cuantificación del ADN, se utilizó el método de absorción de luz ultravioleta, efectuado a partir de diluciones 1/40 en agua destilada, para determinar la absorción de luz UV a las longitudes de onda 230, 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Mod. Lamda Bio10; Perkin-Elmer[®]). Se calculó el contenido de ADN, asumiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg mL⁻¹ de DNA doble cadena (Figura 18).



Figura 18. Medición de absorbancia del DNA en las observaciones.

6.6. Procedimiento de la PCR para la identificación de polimorfismos

Una vez obtenido el ADN por medio del kit QIAampDNA Blood Mini Kit (catalogo 51106 y catalogo 51104; QIAGEN[®]), se prosiguió a identificar los polimorfismos FecX^G, FecX^H y FecX^L del gen BMP15, utilizando la técnica tetraprimer-ARMS PCR (Figura 19) descrita por Ye *et al.* (2001). Se utilizaron dos pares de cebadores descritos por Polley *et al.* (2009) para cada polimorfismo del gen BMP15: **polimorfismo FecX^G** (C/T), cebadores internos (forward 5'-CTT CTT GTT ACT GTA TTT CAA TGA CAA TC-3' y reverse 5'-GAG AGG TTT GGT CTT CTG AAC ACT ATA-3') y cebadores externos (forward 5'-AAG AGG TAG TGA GGT TCT TGA GTT CT-3' y reverse 5'-AGA GAA GAG AAG GGT CTT TTT CTG TA-3'); **polimorfismo FecX^H** (C/T), cebadores internos (forward 5'-GGA GCA TGA TGG GCC TGA AAG TAC CC-3' y reverse 5'-GCT GAC TTG AAA AGG GTG GAG GGA ACA ATA-3') y cebadores externos (forward 5'-AGT TCT GGT GGC ATG GCA CTT CAT CAT T-3' y reverse 5'-CAC CAG CTC ACT GAC AAG GTT CTG GAT G-3'); y, **polimorfismo FecX^L** (A/G), cebadores internos (forward 5'- TGC TCC CCA TCT CTA TAC CCC AAA CTA ATA-3' y reverse 5'- TGT AGT ACC CGA GGA CAT ACT CCC TGA C-3') y cebadores externos (forward 5'- ACC TCT CCC TAA AGG CCT GAA AGA GTT T-3' y reverse 5'- ACA AGA TAC TCC CAT TTG CCT CAA TCA G-3').

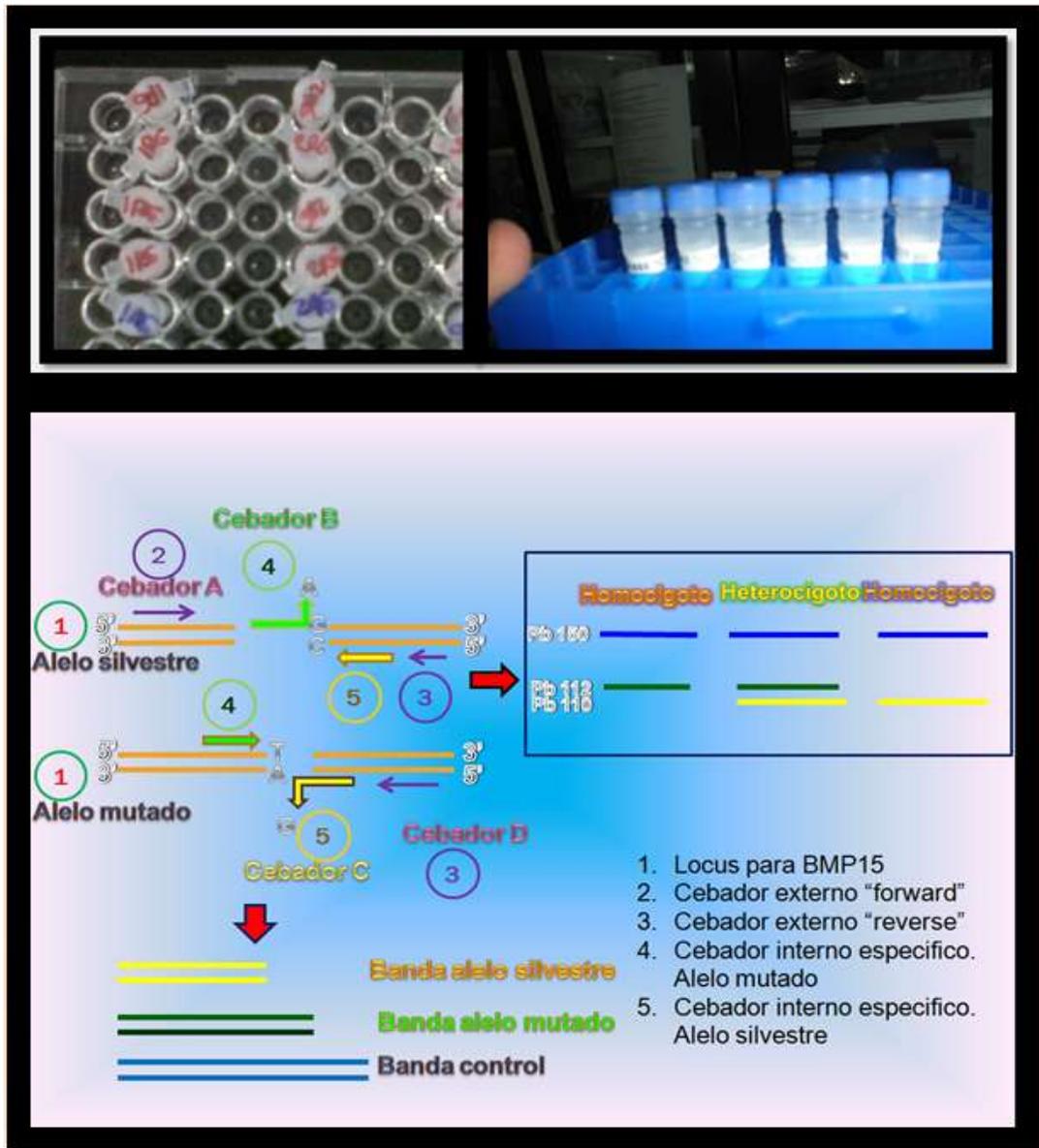


Figura 19. Esquema del Sistema tetraprimer ARMS-PCR para la identificación de alelos de un SNP (polimorfismo de un nucleótido simple).

Para la amplificación genotípica y alélica, se utilizaron 25 μL de reacción, preparada con 2.5 μL de MgCl_2 (30mM); 2.5 μL de buffer azul (amortiguador de reacción 10X, KCl 500 mM, Tris-HCl pH=8.3 100 mM, gelatina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Tritón 1 %, BSA 1.5 mg mL^{-1} ; Bio TecMol[®]); 1 μL de dNTPs Mix (sales de sodio de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, cada uno a 10 mM en agua a pH 7,5; Promega[®]);

1.5 μL de cada cebador (10 pmol μL^{-1}); 1.5 μL de amplificasa (5 U, unidades μL^{-1} ; amplificasa[®]); 1 μL de agua esteril (agua inyectable, PiSA[®]) y, 10 μL de ADN (aproximadamente una media de 140 ng) (Figura 20).

Las condiciones del ciclo térmico para cada polimorfismo fueron las siguientes: polimorfismo FecX^G, una desnaturalización a 94 °C por cuatro minutos, seguido de 32 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 56 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos), y una extensión final de 72 °C por 7 minutos. El polimorfismo FecX^H, una desnaturalización a 94°C por cuatro minutos, seguido de 32 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 58 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos) y una extensión final de 72 °C por 7 minutos. El polimorfismo FecX^L, una desnaturalización a 94°C por cuatro minutos, seguido de 32 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 55 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos) y una extensión final de 72 °C por 7 minutos.



Figura 20. Preparación de las observaciones para la utilización de la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

El producto amplificado por PCR para cada polimorfismo fueron: FecX^G homocigoto silvestre CC (-/-) 102 pb, mutado TT (+/+) 112 pb, y heterocigoto CT ó TC (-/+ ó +/-) 102 pb y 112 pb, descritos por Hanrahan *et al.* (2004); FecX^H homocigoto silvestre CC (-/-) 203 pb, mutado TT (+/+) 248 pb y heterocigoto CT ó

TC (-/+ ó +/-) 203 pb y 248 pb, reportados por Galloway *et al.* (2000). Por último, FecX^L homocigoto silvestre GG (-/-) 252 pb, mutado AA (+/+) 204 pb y heterocigoto GA ó AG (-/+ ó +/-) 252 pb y 204 pb, mencionado por Bodin *et al.* (2007). Por consiguiente, se procedió a verificar el producto amplificado por PCR de las muestras en una cámara vertical (Modelo MVG-216-33; C.B.S Scientific CO[®]), utilizando gel de poliacrilamida al 8 % (22 mL de poliacrilamida; Acrilamida-Bisacrilamida 29:1,p/p, al 40 % p/v), 11 mL de TBE 10X, 77 mL de agua destilada estéril, 65 µL de TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine; SIGMA[®]) y 440 µL al 25 % de (Persulfato de amonio, p/v; SIGMA[®]). En cada pozo se depositó un volumen final de 3 µL: 2 µL de producto de PCR y 1 µL del buffer de carga II, descrito por Sambrook *et al.* (2001), usando como buffer de corrida TBE 1X y 1.5 µL del marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Thermo Scientific[®]). Las condiciones de electroforesis fueron de 247 voltios por 1 hora 30 minutos para todos los polimorfismos (FecX^G, FecX^H y FecX^L). Los resultados fueron evaluados en los tres pasos descritos a continuación: 1) tinción y lavado del gel, finalizada la electroforesis, se drenó el buffer de corrida y se separaron los componentes de la cámara. El cristal al cual se adhirió el gel, se sumergió en una bandeja con ácido acético glacial al 10 % y se agitó por 25 minutos. El gel se retiró del cristal y se sumergió en agua destilada por 6 minutos en agitación constante. El agua se desechó y enseguida se le agregó la solución de tinción (1 g de nitrato de plata, AgNO₃; 1.5 mL de formaldehído en un litro de agua destilada) por 30 minutos. Posteriormente, se retiró la solución y el gel se enjuagó con agua destilada por 5 segundos, dejando escurrir el exceso de líquido; 2) para el revelado de los polimorfismos, el gel se colocó en otra bandeja y se agregó la solución reveladora (dilución de 60 g de carbonato de sodio, Na₂CO₃, en 2 litros de agua destilada), mantenida previamente en refrigeración a 6 °C y, antes de usarse se agregaron 3 mL al 37 % de formaldehído y 400 µL a 10 mg ml⁻¹ de tiosulfato de sodio. Esta solución se dividió en dos partes, 1 L se usó con el gel y el resto se mantuvo en refrigeración, el gel se mantuvo en agitación constante hasta que aparecieron las primeras bandas. Inmediatamente, se agregó el resto de la solución fría, por 30 minutos aproximadamente o hasta tornase

oscuro; 3) en la fotodocumentación, para el registro de la imagen del gel, se empleó el software (Digital Science 1D V.2.0.3.; Kodak[®]) y un transiluminador de luz blanca (Figura 21), para su uso en el análisis estadísticos de frecuencias.

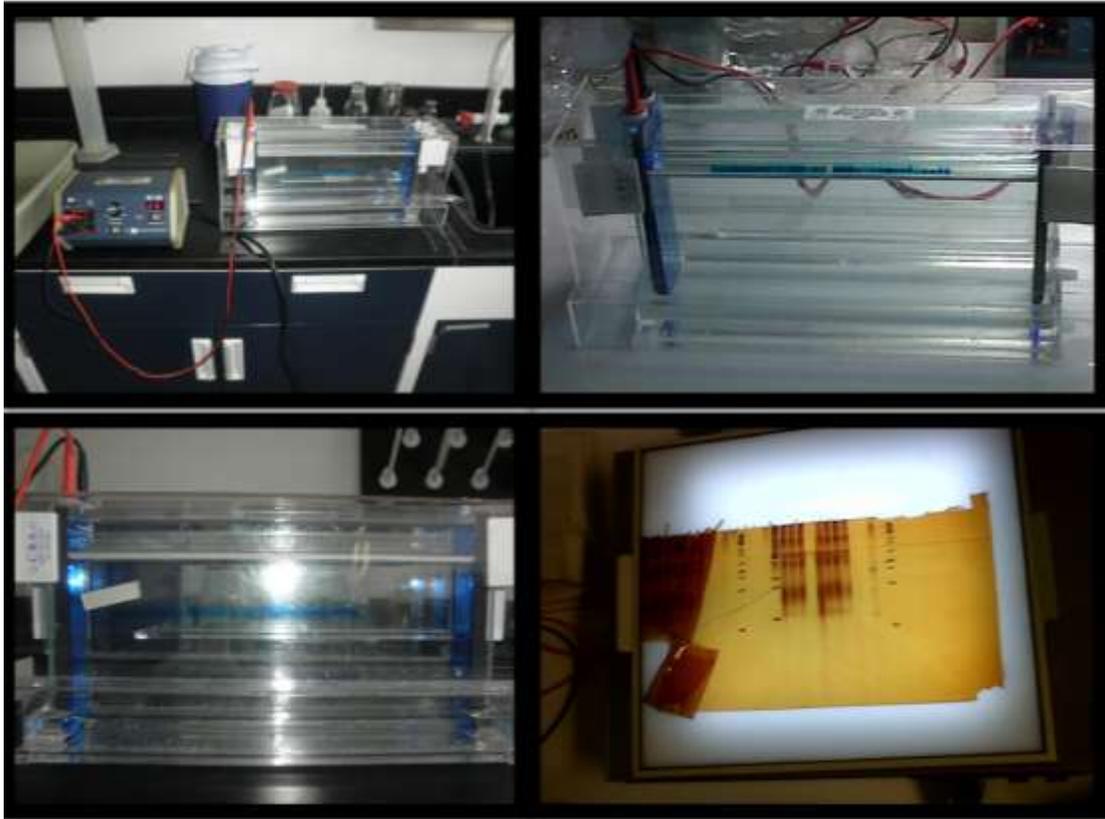


Figura 21. Electroforesis para detectar los alelos ($FecX^G$, $FecX^H$ y $FecX^L$) con la técnica tetraprimer ARMS PCR.

6.7. Procedimiento de la PCR para la identificación de los exones 1 y 2.

El ADN extraído con la metodología descrita por Reineke *et al.* (1998) y Moller *et al.* (1992), se utilizó para la amplificación del exón 1 de 325pb (AF236078) y el exón 2 de 857pb (AF236079) del gen BMP15 por la técnica de PCR punto final, descritos por Hanrahan *et al.* (2004). La reacción utilizada de 25 μ L se preparó con 2.5 μ L de $MgCl_2$ (30mM); 2.5 μ L de buffer azul (amortiguador de reacción 10X, KCl 500 mM, Tris-HCl pH=8.3 100 mM, gelatina 100 μ g /mL⁻¹, Tritón 1 %, BSA 1.5 mg/mL⁻¹; Bio TecMol[®]); 1 μ L de dNTPs Mix (sales de sodio de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, cada uno a 10 mM en agua a pH=7,5; Promega[®]); 1.5 μ L de cada cebador (10 pmol μ L⁻¹); 1.5 μ L de amplificasa (5 U, unidades μ L⁻¹; amplificasa[®]);

1 μL de agua estéril (agua inyectable, PiSA[®]); y 13 μL de ADN (aproximadamente con media de 140 ng)(Figura 18). Cada exón empleó un par diferente de cebadores descritos a continuación: para el exón 1 (forward B-13: 5'-CAT GCT GCC TTG TCC CAC-3' y reverse B-28: 5'-AGG CAA TGT GAA GCC TGA CA-3') y exón 2 (forward B-25: 5'-CAG TTT GTA CTG AGC AGG TC- 3' y reverse B-4: 5'-TTC TTG GGA AAC CTG AGC TAG C- 3') (Figura 22). Las condiciones del ciclo térmico para cada exon fueron las siguientes; a) exón 1, desnaturalización a 94 °C por cuatro minutos, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, alineamiento a 56 °C por 50 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto 30 segundos) y una extensión final de 72 °C por 7 minutos; b) exón 2, desnaturalización a 94°C por cuatro minutos, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, alineamiento a 58 °C por 50 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto 30 segundos) y una extensión final de 72 °C por 7 minutos.

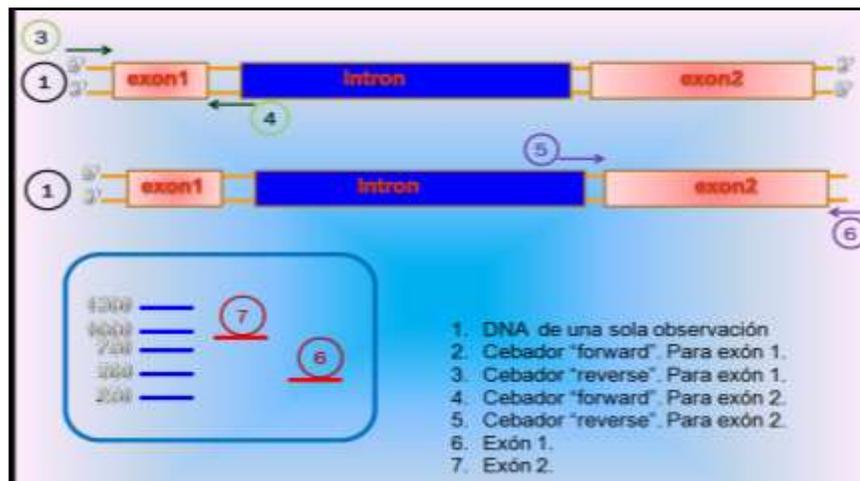


Figura 22. Esquema de la amplificación para la identificación del exón 1 y exón 2.

El producto amplificado por PCR para el exón 1 de 325 pb y exón 2 de 857 pb mencionados por Hanrahan *et al.* (2004), se verificaron en muestras en gel de agarosa al 1.4 % (1.4 g de agarosa y 100 mL de buffer TBE 1X; Tris Borato-EDTA) por medio de una electroforesis, en una cámara modelo horizon 58 (cámara de electroforesis; life Technologies[®]). En cada pozo se depositó un

volumen final 18 μL : 4 μL del buffer de carga II, descrito por Sambrook *et al.* (2001) y 14 μL de producto de PCR; usando como buffer de corrida TBE 1X. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ durante 30 minutos y 1.5 μL de marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Thermo Scientific®). Las condiciones de electroforesis fueron de 88 voltios por 1 hora 45 minutos para el exón 1 y de 50 minutos para el exón 2. Los resultados fueron evaluados en el fotodocumentador (Modelo Gel Doc 2000; Bio Rad®) de luz ultravioleta (UV) y se capturaron las imágenes por computadora (Quantityone one; Bio Rad®), para la identificación de los productos a purificar, según las instrucciones del kit (MinElute Gel Extraction Kit; QIAGEN®), que se enviaron a la empresa (MICRO GEN®, Korea) para su secuenciación. Cada muestra fue verificada visualmente con el fin de eliminar falsos positivos (Figura 23).

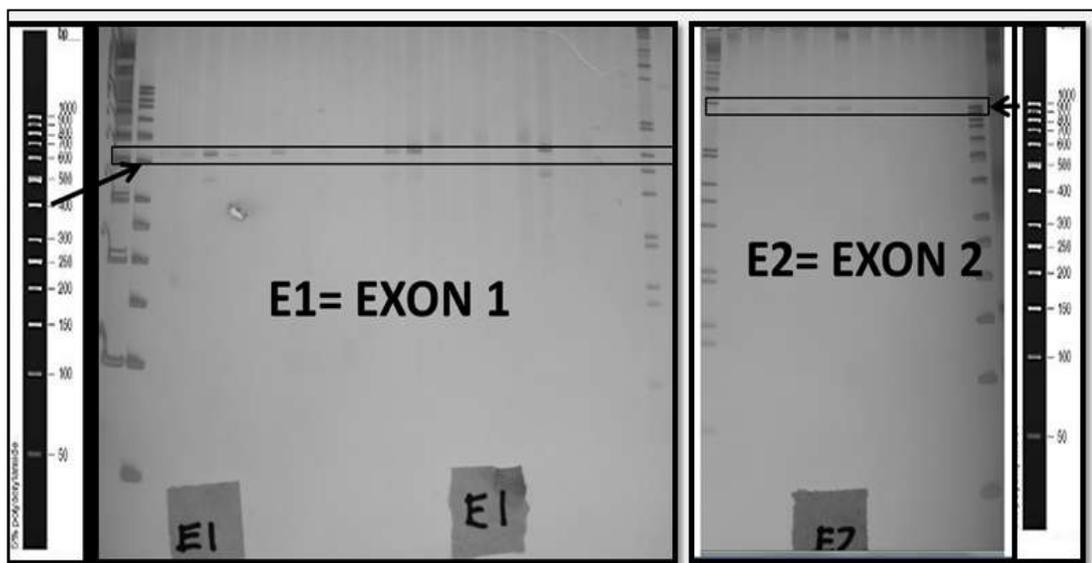


Figura 23. Visualización del exón 1 y exón 2.

6.8. Secuenciación

La secuenciación del producto de PCR purificado de los exones 1 y 2, se realizó según las especificaciones de la empresa (MICROGEN INC®, Korea). Para ello, se colocaron 10 μL del producto purificado en tubos Eppendorf de 1.5 mL (Figura 24), para obtener una buena lectura de las secuencias que sirvieron para

identificar las mutaciones $FecX^G$, $FecX^L$ y $FecX^H$, descritos por Hanrahan *et al.* (2004), Bodin *et al.* (2007) y Galloway *et al.* (2000), respectivamente. Para el análisis genómico se utilizó el programa MEGA versión 5.05 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, 5.05; Mega®).



Figura 24. Envío de las observaciones del exon1 y exón 2 a secuenciar.

6.9. Análisis estadístico de frecuencias

Para la estimación de los polimorfismos ($FecX^G$, $FecX^L$ y $FecX^H$), se evaluaron las frecuencias genotípicas y alélicas (Hanrahan *et al.*, 2004; Bodin *et al.*, 2007; Galloway *et al.*, 2000). Después de asignar el genotipo de cada uno de los animales, se estimó mediante la prueba de ajuste del equilibrio de Hardy-Weinberg para las frecuencias genotípicas y las frecuencias alélicas (Crow, 1999) se compararon mediante la prueba de Chi.

6.10. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa MEGA 5.05 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis 5.05; Mega®) para la búsqueda de polimorfismos. Inicialmente, se realizó un alineamiento (ClustalW 1.6) para determinar la existencia de polimorfismos entre las secuencias obtenidas y, se realizó posteriormente otro alineamiento de las secuencias obtenidas de la oveja Pelibuey con las secuencias del gen BMP15 de otros ovinos reportadas en el banco de genes (número de acceso AF236078, AF236079 y AF268477).

7. RESULTADOS Y DISCUSION.

7.1. Estimación de las frecuencias genotípicas y alélicas de polimorfismos del gen BMP15 (FecX^G, FecX^L y FecX^H).

Se registraron las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos FecX^G, FecX^L y FecX^H evaluados individualmente en 253 ovejas adultas de la raza Pelibuey. Para el polimorfismo FecX^G, se determinó un 45 % en genotipo homocigoto silvestre CC (-/-; 102 pb), un 43 % en el genotipo mutado TT (+/+; 112 pb) y un 12 % para el heterocigoto CT (-/+; 102 pb) o TC (+/-; 112 pb) (Cuadro 4; Figura 25).

Las frecuencias genotípicas del polimorfismo FecX^G fueron muy similares entre genotipos homocigotos mutado TT y silvestre CC; sin embargo, hubo una gran diferencia entre los homocigotos TT y CC en comparación con el heterocigoto TC ó CT (P<0.01). Las frecuencias alélicas del polimorfismo FecX^G fueron similares en el genotipo (TT) y (CC) (P>0.05) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo FecX^G en el gen BMP15 de ovejas Pelibuey.

Genotipo	Número de observaciones (animales)	Frecuencia genotípica	Frecuencia alélica
TT (+/+)♥	110	0.43 ^a	0.49 ^a
TC ó CT (+/-)ó(-/+)*	30	0.12 ^b	
CC (-/-)♥	113	0.45 ^a	0.51 ^a
Total	253	1.00	1

Valores con diferente literal en la misma columna no son iguales. Equilibrio Hardy-Weinberg (χ^2 , P<0.01); *heterocigoto; ♥homocigotos.

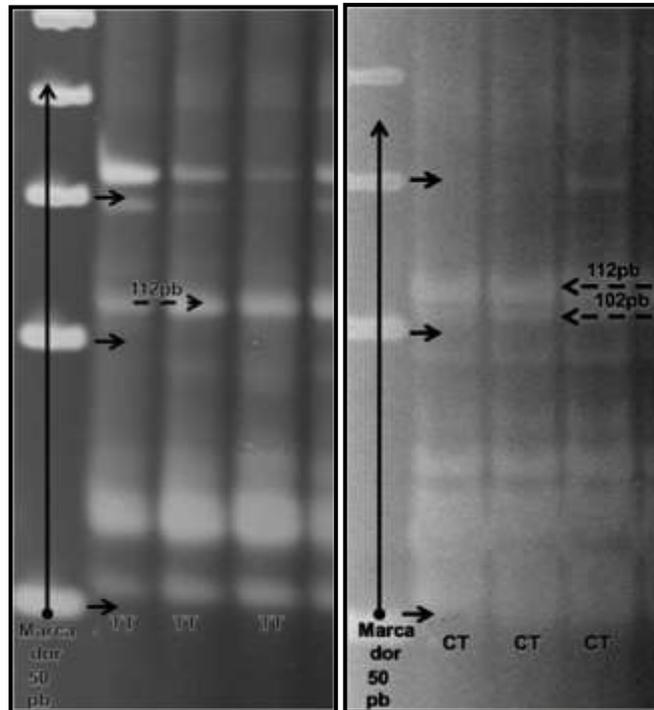


Figura 25. Gel de poliacrilamida al 8 % mostrando el resultado de la tretraprimer ARMS-PCR para el polimorfismo en FecXG. Homocigoto mutado **T/T (+/+; 112pb)** y heterocigoto **C/T ó T/C (-/+ ó +/-; 102 y 112 pb)**, marcador de 50 pb.

En el polimorfismo FecX^L, se presentó un 66 % para homocigoto silvestre GG (-/-: 252 pb), un 29 % en genotipo mutado AA (+/+; 204 pb) y un 5 % para el heterocigoto GA ó AG (-/+ ó -/+; 252 pb y 204 pb) (Cuadro 5; Figura 26).

Las frecuencias genóticas del polimorfismo FecX^L fueron muy diferentes entre los tres genotipos; homocigoto mutado AA, homocigoto silvestre GG y heterocigoto GA ó AG. Se observa cómo es relevante el homocigoto silvestre GG (P<0.01). Las frecuencias alélicas del polimorfismo FecX^L fueron distintas entre genotipo (AA) y (GG) (P<0.01) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo $FecX^L$ en el gen BMP15 de ovejas Pelibuey.

Genotipo	Número observaciones (animales)	Frecuencia genotípica	Frecuencia alélica
AA (+/+)♥	73	0.29 ^a	0.31 ^a
GA ó AG (+/-)ó(-/+)*	12	0.05 ^b	
GG (-/-)♥	168	0.66 ^c	0.69 ^b
Total	253	1.00	1

Valores con diferente literal en la misma columna no son iguales equilibrio Hardy-Weinberg (χ^2 , $P < 0.01$); *heterocigoto; ♥homocigotos.

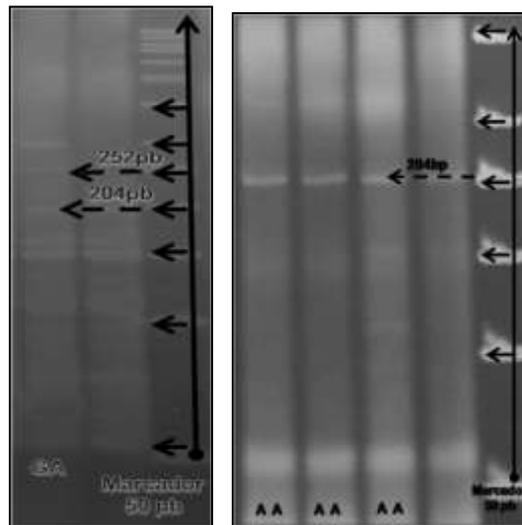


Figura 26. Gel de poliacrilamida al 8 % mostrando el resultado de la tetraprimer ARMS-PCR para el polimorfismo en $FecX^L$. Homocigoto silvestre **AA (-/-; 204 pb)** y heterocigoto **GA ó AG (-/+ ó +/-; 252 pb y 204 pb)**, marcador de 50 pb.

Y referente al polimorfismo $FecX^H$, no se reporta la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas, ya que solo se presentó el homocigoto silvestre CC (-/-; 203 pb) (Figura 27).

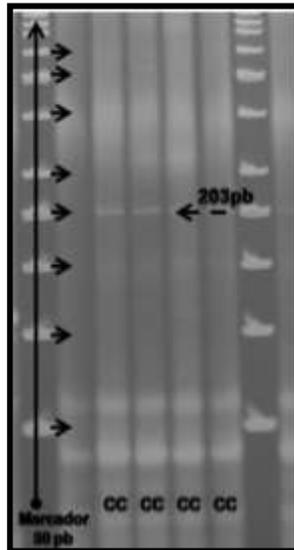


Figura 27. Gel de poliacrilamida al 8 % mostrando el resultado de la tetraprimer ARMS-PCR para el polimorfismo en $FecX^H$. Homocigoto silvestre **CC (-/-; 203 pb)**, marcador de 50 pb.

En este estudio se determinaron los polimorfismos $FecX^G$, $FecX^L$ y $FecX^H$, por primera vez, en ovejas adultas de la raza Pelibuey, confirmados por secuenciación en el exón 2 (Galloway *et al.*, 2000). Dichos polimorfismos se han reportado en razas de lana, tales como Romney, Lacaune, Belclare y Cambridge (Galloway *et al.*, 2000; Davis, 2005; Davis *et al.*, 2006; Bodin *et al.*, 2007), respectivamente. Sin embargo, algunos estudios reportan no identificar el polimorfismo ($FecX^G$) en la raza de lana iraní Baluchi (Moradband *et al.*, 2011) ni en la raza de pelo Santa Inés (Luna, 2009). Lo anterior es similar a lo reportado por estos dos últimos autores con la raza Pelibuey, donde no se encuentra la mutación en el polimorfismo ($FecX^H$) que afecta la tasa de ovulación y fertilidad descrita en la raza Romney (Galloway *et al.*, 2002).

7.2. Distribución de los partos asociados a los polimorfismos $FecX^G$, $FecX^L$ y $FecX^H$.

La mejor aptitud de producción probable (prolificidad) obtenida en las 253 ovejas fue comparada con la frecuencia genotípica de cada polimorfismo ($FecX^G$ y $FecX^L$) para asociarlos con la frecuencia del tipo de parto dada en cada uno de ellos. El principal genotipo del polimorfismo $FecX^G$ fue el homocigoto silvestre CC (-/-), seguido por el homocigoto mutado TT (+/+) y al final, el heterocigoto TC ó CT (+/-) ó (-/+). La distribución de los partos registraron un 2.4 % de parto triple, 46.3 % parto simple y un 51.3 % de partos dobles. El tipo de parto doble presentó el mayor porcentaje en todos los genotipos (Cuadro 6). El tipo de parto doble en la oveja de la raza Pelibuey representó un 51.3 % de los 1050 partos; el genotipo homocigoto mutado fue un 52 % de 452 partos, el genotipo heterocigoto fue 52% de 126 partos y el homocigoto silvestre tuvo un 51 % de 472 partos ($P < 0.01$). Para el último polimorfismo $FecX^H$ no se estimaron las frecuencias, ya que solo presentó el genotipo homocigoto silvestre CC (-/-; 203 pb) de 1050 partos, 486 fueron partos simples, 539 partos dobles y 25 partos triples, cual corresponde a un 46.3 %, 51.3 % y 2.4 % ($P < 0.01$), respectivamente (Figura 27).

La asociación de la distribución de los partos con las frecuencias genotípicas del polimorfismo $FecX^G$ en el gen BMP15 en ovinos Pelibuey, fueron muy similares en el genotipo (TT) y genotipo (CC); sin embargo, hubo una gran diferencia entre los homocigotos TT y CC en comparación con el heterocigoto TC ó CT ($P < 0.01$) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Distribución de los partos asociada a las frecuencias genotípicas del polimorfismo FecX^G en el gen BMP15 de ovejas Pelibuey.

Genotipo	Frecuencia genotípica	Tipo de parto [☼]			Asociación de las frecuencias
		S [*]	D [†]	T [☐]	
TT (+/+) [♥]	0.43	209	232	11	452
		0.46 ^a	0.52 ^b	0.02 ^c	43 %
TC ó CT (+/-)ó(-/+) [*]	0.12	58	65	3	126
		0.46 ^a	0.52 ^b	0.02 ^c	12 %
CC (-/-) [♥]	0.45	219	242	11	472
		0.46 ^a	0.51 ^b	0.02 ^c	45 %
Total	1.00	486	539	25	1050
		0.463	0.513	0.024	100 %

Valores con diferente literal en la misma fila no son iguales. Equilibrio Hardy-Weinberg (χ^2 , $P < 0.01$); ^{*}heterocigoto; [♥]homocigotos; ^{*}simple; [†]doble; [☐]triple.

☼ Total de partos de los animales observados.

La asociación de la distribución de los partos con las frecuencias alélicas del polimorfismo FecX^G en el gen BMP15 en ovinos Pelibuey, fueron muy similares en el genotipo TT y genotipo CC ($P > 0.05$) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Distribución de los partos asociada a las frecuencias alélicas del polimorfismo FecX^G en el gen BMP15 de ovejas Pelibuey.

genotipo	Frecuencias alélicas	Tipo de parto [☼]			Asociación de las frecuencias
		S [*]	D [†]	T [☼]	
TT (+/+)♥	0.49	238	264	12	514
		0.46 ^a	0.51 ^b	0.02 ^c	49 %
CC (-/-)♥	0.51	248	275	13	536
		0.46 ^a	0.51 ^b	0.02 ^c	51 %
Total		486	539	25	1050
		0.463	0.513	0.024	100 %

Valores con diferente literal en la misma fila no son iguales. Equilibrio Hardy-Weinberg (χ^2 , $P>0.05$); ♥homocigotos; *simple; †doble; ☼triple.

☼Total de partos de los animales observados.

En el polimorfismo FecX^L, el principal genotipo fue el homocigoto silvestre GG (-/-), seguido por el homocigoto mutado AA (+/+) y al final, el heterocigoto GA ó AG (+/-) ó (-/+). La distribución de los partos registró un 2 % de parto triple, 46 % parto simple y un 51 % de partos dobles. El tipo de parto doble presentó el mayor porcentaje en todos los genotipos (Cuadro 8). El tipo de parto doble representó un 51.3 % de los 1050 partos; el genotipo homocigoto mutado fue un 51% de 304 partos, el genotipo heterocigoto fue un 52% de 52 partos y el homocigoto silvestre tuvo un 51 % de 694 partos ($P<0.01$).

La asociación de la distribución de los partos con las frecuencias genotípicas del polimorfismo FecX^L en el gen BMP15 en ovinos Pelibuey, fueron diferentes en el genotipo (AA), genotipo (GG) y genotipo (TC ó CT) ($P<0.01$) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Distribución de los partos asociada a las frecuencias genotípicas del polimorfismo FecX^L en el gen BMP15 de ovejas Pelibuey.

Genotipo	Frecuencia genotípica	Tipo de parto [☼]			Asociación de las frecuencias
		S [*]	D [†]	T [☐]	
AA (+/+) [♥]	0.29	141	156	7	304
		0.46 ^a	0.51 ^b	0.02 ^c	29 %
GA ó AG (+/-)ó(-/+) [*]	0.05	24	27	1	52
		0.46 ^a	0.52 ^b	0.02 ^c	5 %
GG (-/-) [♥]	0.66	321	356	17	694
		0.46 ^a	0.51 ^b	0.02 ^c	66 %
Total	1.00	486	539	25	1050
		0.463	0.513	0.024	100 %

Valores con diferente literal en la misma fila no son iguales. Equilibrio Hardy-Weinberg (χ^2 , $P < 0.01$); ^{*}heterocigoto; [♥]homocigotos; ^{*}simple; [†]doble; [☐]triple.

☼ Total de partos de los animales observados.

La asociación de la distribución de los partos con las frecuencias alélicas del polimorfismo FecX^L en el gen BMP15 en ovinos Pelibuey, fueron diferentes en el genotipo (AA) y genotipo (GG) ($P < 0.01$) (Cuadro 9).

Cuadro 9. La distribución de partos asociada a las frecuencias alélicas del polimorfismo FecX^L en el gen BMP15 de ovejas Pelibuey.

Genotipo	Frecuencias alélicas	Tipo de parto ☼			Asociación de las frecuencias
		S [*]	D [†]	T [‡]	
AA (+/+) ♣	0.31	151	167	8	326
		0.46 ^a	0.51 ^b	0.02 ^c	31%
GG (-/-) ♣	0.69	335	372	17	724
		0.63 ^a	0.69 ^b	0.03 ^c	69 %
Total		486	539	25	1050
		0.463	0.513	0.024	100 %

Valores con diferente literal en la misma fila no son iguales. Equilibrio Hardy-Weinberg (χ^2 , $P < 0.01$); ♣homocigotos; *simple; †doble; ‡triple.

☼ Total de partos de los animales observados.

Estudios previos indican que las mutaciones del gen BMP15; FecX^G, FecX^L y FecX^H, mostraron un comportamiento similar en tasa de ovulación y prolificidad de acuerdo al genotipo; el homocigoto mutado es estéril con ovarios hipoplásicos, con aumento en la tasa ovulatoria de 0.7, 1.5 y 1, respectivamente; en razas de lana Cambridge, Belclare, Lacaune y Romney (Hanrahan *et al.*, 2004; Davis, 2005; Davis *et al.*, 2006; Bodin *et al.*, 2007). Sin embargo, el genotipo homocigoto mutado observado en ovejas adultas de la raza Pelibuey es fértil tanto para el polimorfismo FecX^G como para el FecX^L, con un 43 % y un 29 % del total de partos, respectivamente. Además, los resultados encontrados en la presente investigación con el análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas en la determinación de los polimorfismos, muestran una diferencia significativa de partos dobles (52 % en 452 partos), para el homocigoto mutado (TT) del polimorfismo FecX^G (X^2 , $P < 0.01$). De la misma manera, el homocigoto mutado del polimorfismo FecX^L (AA), presentó una frecuencia significativa de partos dobles

(51 % en 304 partos) (X^2 , $P < 0.01$). Esto puede ser explicado según lo reportado por Scaramuzzi *et al.* (2011), quienes indican que probablemente el gen BMP15 esté involucrado en un complejo con otros genes de la misma familia, como el Factor de Crecimiento y Diferenciación 9 (GDF9) referente a la tasa de ovulación (Hanrahan *et al.*, 2004), el cual tiene un comportamiento similar al BMP15 en la raza Belclare y Cambridge, donde se muestra un incremento de tasa ovulatoria para heterocigotos, mientras que para homocigotos mutados se observa esterilidad, y al receptor 1B de la Proteína Morfogénica Ósea (BMPR-1B), el cual contrasta con BMP15 y GDF9, ya que el genotipo homocigoto mutante tiene una mayor ovulación de 5-9 folículos, en comparación con 1-2 del genotipo homocigoto silvestre (Scaramuzzi *et al.*, 2011). Esta fertilidad en los homocigotos mutados de la raza Pelibuey, similar al BMPR-1B, se puede deber probablemente, según Lahoz *et al.* (2011) y Scaramuzzi *et al.* (2011), a que el homocigoto mutante del BMP15 afecta el desarrollo temprano del ovocito, debido a la respuesta precoz del folículo y de las células de la granulosa a la FSH y LH, que provoca la ovulación y luteinización de numerosos folículos maduros de menor tamaño por la sensibilidad precoz a la LH, dando como resultado, una mayor tasa de ovulación. Mientras tanto, con la respuesta favorable en este estudio en el homocigoto mutado para $FecX^G$ y $FecX^L$ al no mostrar esterilidad, podría también explicarse a la selección que el productor del rebaño ha venido realizando en los últimos años, seleccionando aquellos animales más prolíficos. De esta manera, en un estudio realizado por De Lucas *et al.* (2012) en el mismo rebaño, reportan que el índice de prolificidad en las hembras al primer parto es 1.40 ± 0.08 , 2 a 4 años 1.67 ± 0.06 , 5 a 7 años 1.75 ± 0.07 ($P < 0.01$) y 8 a 10 años 1.80 ± 0.29 ($P > 0.05$), valores relativamente cercanos a dos corderos por parto.

Los resultados en este estudio muestran una frecuencia significativa en los partos dobles, tanto para los homocigotos silvestres y mutados, como para los heterocigotos (X^2 , $p \leq 0.01$). Esta tendencia para obtener más partos dobles, en contraste con partos triples, es conveniente y deseable para el productor (Laviña *et al.*, 2009), porque las ovejas soportan fisiológica y anatómicamente, criar dos

corderos. En las ovejas de la raza Aragonesa, con la distribución de partos para el polimorfismo FecXR del gen BMP15, el genotipo heterocigoto presentó un mayor porcentaje en partos triples (Laviña *et al.*, 2009). Por el contrario, en este estudio, para el polimorfismo FecX^G y para FecX^L, los genotipos heterocigotos (CT ó TC) y (GA ó AG) presentaron 2 % de partos triples en 452 partos ($p \leq 0.01$) y 2 % en 52 partos ($p \leq 0.01$). En el gen GDF9, para el índice de prolificidad con el polimorfismo FecXG en la raza Small Tailed (Chu *et al.*, 2006) hay un aumento de 0.55 para genotipos heterocigotos; en cambio, los homocigotos mutados (TT) son estériles. Pero que un genotipo homocigoto mutado indique provocar esterilidad en razas Romney, Belclare, Lacaune y Cambridge (Davis, 2005; Davis *et al.*, 2006; Bodin *et al.*, 2007), no necesariamente en otras razas puede ocurrir lo mismo. Así, en el genotipo mutado FecS^I en la raza Santa Inés para el gen GDF9 (Silva *et al.*, 2010), es posible que esta mutación no produzca un efecto drástico en la disminución de la actividad de la proteína madura, lo cual hace posible que en ovejas homocigotas E/E no exista una pérdida total de la acción del GDF9 (Pérez, 2012). Situación que podría suceder con el gen BMP15 en la oveja Pelibuey, en la cual el efecto de los polimorfismos con el genotipo homocigoto mutado del gen BMP15 no provoca esterilidad como ocurre en otras razas evaluadas.

7.3.Evaluación de las secuencias

Los productos secuenciados, exón 1 de 325 pb y exón 2 de 857 pb, del gen BMP15 con los cebadores descritos por Hanrahan *et al.* (2004), se compararon con un alineamiento de otras secuencias del banco de genes con numero de acceso (AF236078, AF236079 y AF268477). No mostraron ninguna variación de las mencionadas por Hanrahan *et al.* (2004); Bodin *et al.* (2007) y Galloway *et al.* (2000) en la base nucleotídica y, ninguna mutación observada en los geles de poliacrilamida, fue posible confirmar con los adenogramas para los polimorfismos FecX^G (Figura 28); FecX^L (Figura 29) y FecX^H (Figura 30).

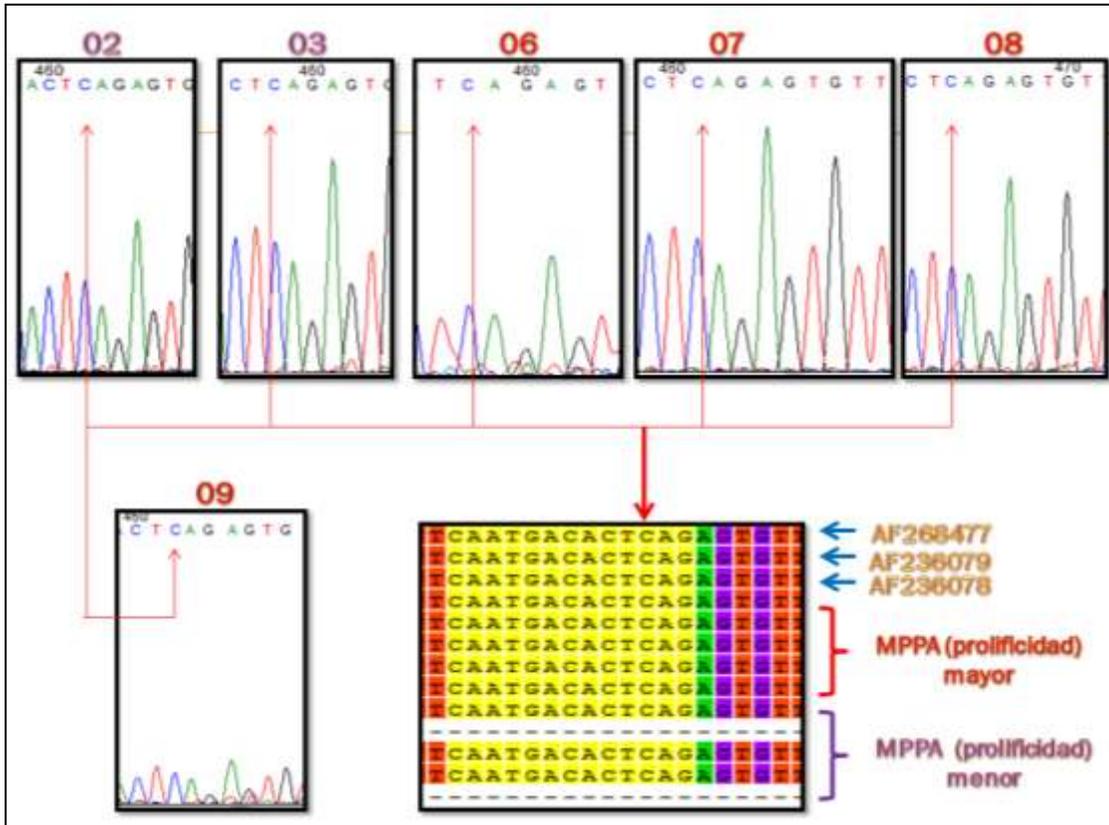


Figura 28. Alineamiento de secuencias del polimorfismo FecXG. Búsqueda de la variación (cambio C por T) en la base nucleotídica, comparando los animales más prolíficos (llave roja) y menos prolíficos (llave morada), con otras secuencias del banco de genes (flechas azules). Los guiones seguidos en el alineamiento es debido a un corte en las secuencias para su correcta comparación en el alineamiento. La flecha roja en los adenogramas muestra la ubicación de la posible variación en SNP (polimorfismo de un solo nucleótido). Se muestran líneas superpuestas para la observación 06.

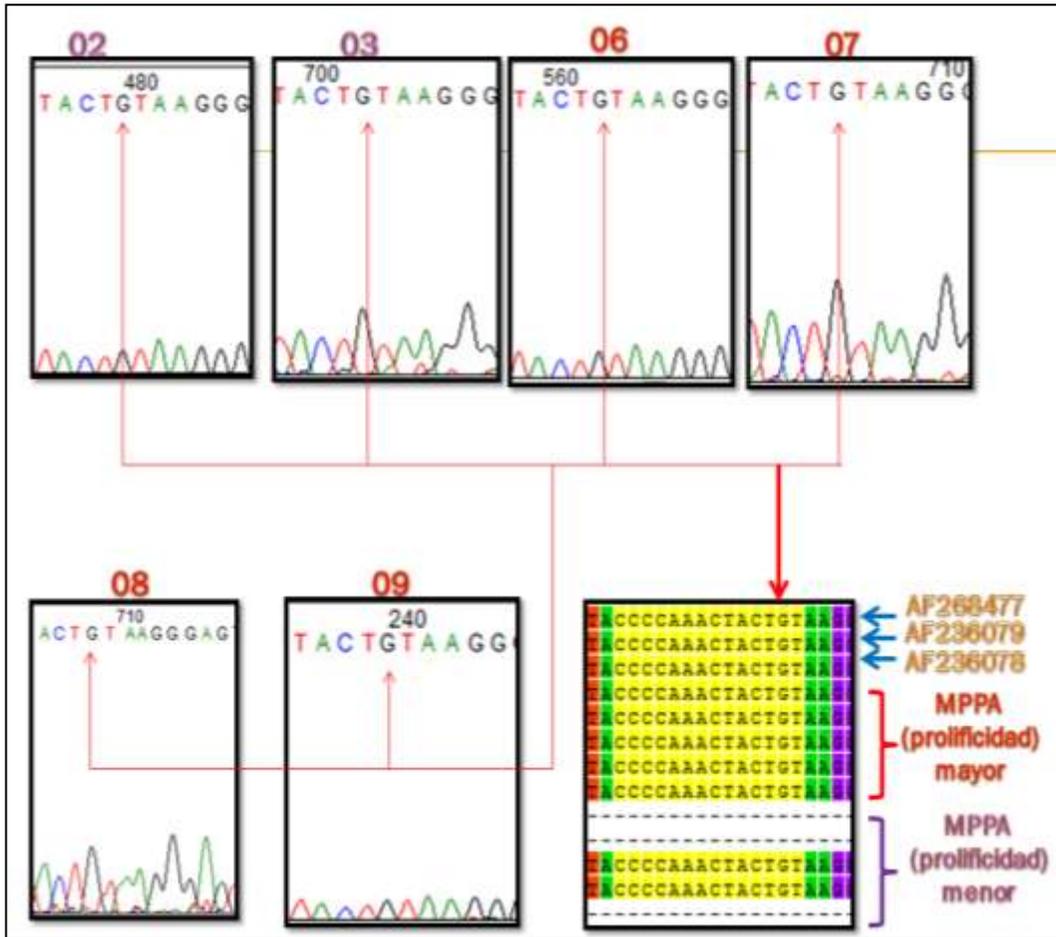


Figura 29. Alineamiento de secuencias del polimorfismo FecXL. Búsqueda de la variación (cambio G por A) en la base nucleotídica, comparando los animales más prolíficos (llave roja) y menos prolíficos (llave morada), con otras secuencias del banco de genes (flechas azules). Los guiones seguidos en el alineamiento es debido a un corte en las secuencias para su correcta comparación en el alineamiento. La flecha roja en los adenogramas muestra la ubicación de la posible variación SNP (polimorfismo de un nucleótido simple). Se muestra líneas superpuestas para la observación 08, 03 y 07.

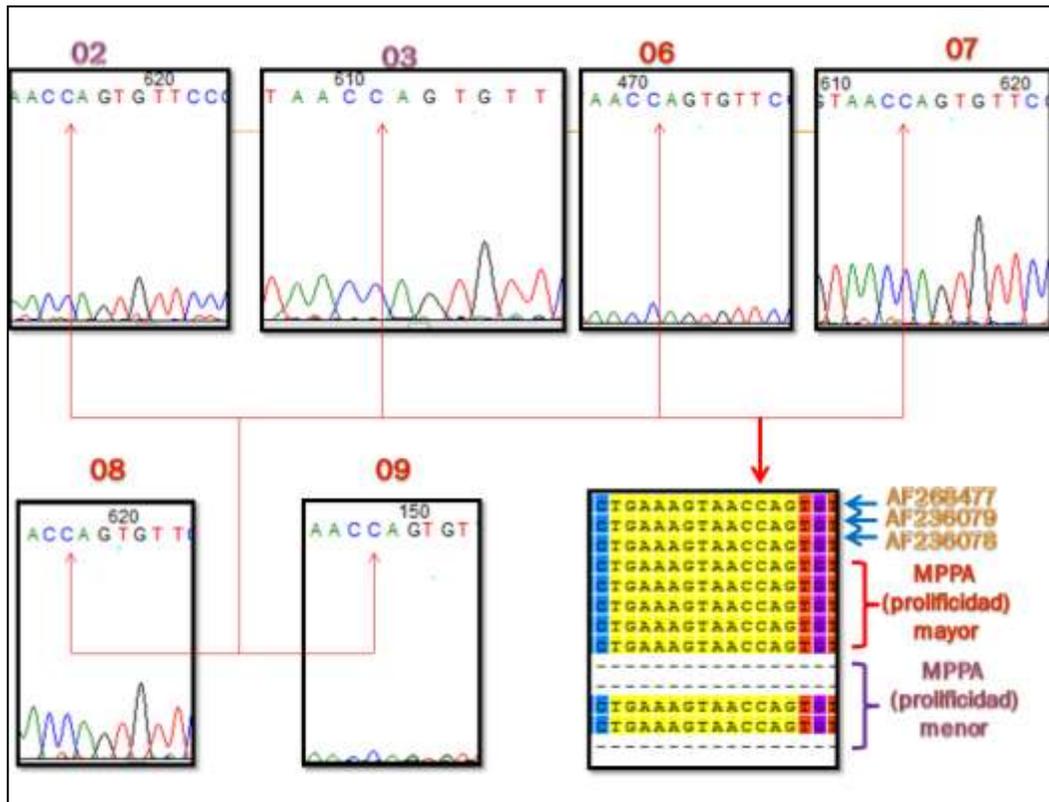


Figura 30. Alineamiento de secuencias del polimorfismo FecXH. Búsqueda de la variación (cambio C por T) en la base nucleotídica, comparando los animales más prolíficos (llave roja) y menos prolíficos (llave morada), con otras secuencias del banco de genes (flechas azules). Los guiones seguidos en el alineamiento es debido a un corte en las secuencias para su correcta comparación en el alineamiento. La flecha roja en los adenogramas muestra la ubicación de la posible variación SNP (polimorfismo de un nucleótido simple).

El análisis de la secuencias es una de la herramientas importante en estudios moleculares para mutaciones puntuales. En la presente investigación, se realizó un análisis de las secuencias realizadas y alineamiento del exón 1 y exón 2 del gen BMP15 con el programa MEGA 5.05 (Molecular Evolutionary Genetics

Analysis 5.05; Mega®) en ovejas de la raza Pelibuey, para la identificación de los polimorfismos reportados por Hanrahan *et al.* (2004); Bodin *et al.* (2007) y Galloway *et al.* (2000), conocidos por influir en la tasa ovulatoria y prolificidad de las razas Cambridge, Romney, Lacaune y Belclare. Sin embargo, los resultados obtenidos y evidenciados con los adenogramas, no mostraron ninguna variación de la base nucleotídica en la posición, donde los polimorfismos estudiados, FecX^G, FecX^L y FecX^H, presentan las mutaciones mencionadas. No obstante, el alineamiento de las secuencias permitió identificar y confirmar que las mutaciones de los polimorfismos, FecX^G, FecX^L y FecX^H, se encuentran en el exón 2. La falta de claridad en los adenogramas por suposición de líneas, como lo ocurrido en el estudio de la secuencias del Pelibuey, puede deberse a la insuficiente cantidad de ADN provocando una señal demasiado baja o a la contaminación del ADN por algún cebador mal purificado ó degradado. Por lo anterior, se sugiere realizar otros estudios sobre los efectos de los polimorfismos asociados a los genes mayores que influyen en la tasa ovulatoria y en el índice de prolificidad en la oveja Pelibuey, con un número mayor de animales secuenciados.

8. CONCLUSIONES

Los polimorfismos FecX^G, FecX^H y FecX^L ubicados en el exón dos del gen BMP15, fueron determinados por primera vez, en ovejas de la raza Pelibuey. De los polimorfismos estudiados, y con el análisis de la mejor aptitud de producción probable (MAPP o MPPA) de los 10 partos más recientes, solo los genotipos homocigotos de los polimorfismos FecX^G y FecX^L se asociaron al incremento de la prolificidad en las ovejas Pelibuey, por tener un mayor número de partos dobles. Y solo se presentó el genotipo homocigoto silvestre en el polimorfismo FecX^H. En cambio, el genotipo heterocigoto tuvo muy poca influencia en la variable prolificidad. Esto probablemente fue debido al criterio de selección del productor en el área de estudio, dado que utiliza como pie de cría a los animales más prolíficos de partos dobles, tal y como se indica en los registros reproductivos y productivos del rebaño.

El número de ovejas prolíficas estudiadas fue limitado, por lo que para confirmar el efecto de los homocigotos mutados y silvestres asociados aun mayor número de partos, en especial partos dobles; es necesaria la utilización de un mayor número de animales provenientes de otras regiones del país con registros de prolificidad, el análisis de (MPPA) y la utilización de un sistema BLUP (best linear unbiased prediction) para el análisis de los datos, donde se incluya la mayoría de los efectos (efecto materno, paterno, ambiental, entre otros), y además, la búsqueda de mutaciones en otros genes reportados con efecto en prolificidad.

Los exones 1 y 2 del gen BMP15 fueron amplificados mediante la técnica de PCR y secuenciados para la búsqueda de los polimorfismos FecX^G, FecX^H y FecX^L, confirmando su ubicación en el exón 2.

9. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar J.R., O. Mitchell, B. Lafuente y J. Sánchez. 1995. Efecto de variantes de suplementación en ovejas en el último tercio de la gestación sobre el peso de los corderos al nacer y a los 30 días. *Rev. Prod. Animal.* 9:41.
- Altarriba J., C. Moreno, A. García-Córtés, G. Yagüe y R. Ponz. 2001. Mejora genética para la prolificidad en Rasa aragonesa. XXV Jornadas SEOC 2001, 265-270.
- Arroyo L. J., J. Gallegos-Sánchez, G. A. Villa y M. J. Valencia. 2006. Sistemas neurales de retroalimentación durante el ciclo reproductivo anual de la oveja: Una revisión. *INCI, ene.*, vol.31, no.1, p.8-15. ISSN 0378-1844.
- Baird D.T. and A.S. McNeilly. 1987. Widening the "gate" by infusion of FSH before luteal regression in Welsh Mountain Ewes increases ovulation rate. In "Neuroendocrinology of Reproduction: Proceedings of VIth Reiner de Graaf Symposium Nijmegen, Netherlands" (Ed. R. Rolland.) pp. 68-73. (Excerpta Medica: Amsterdam.)
- Baird D.T. and B.K. Campbell. 1998. Follicle selection in sheep with breed differences in ovulation rate. *Mol. Cell. Endocrinol.* 145, 89-95. doi:10.1016/S0303-7207(98)00174-9
- Barrell G.K., S.M. Moenter, A. Caraty and F.J. Karsch. 1992. Seasonal changes of gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe. *Biol. Reprod.* 46: 1130-1135.

- Bartlewski M.P., J. Vanderpol, P.A. Beard, J.S. Cook and C.N. Rawlings. 2000. Ovarian antral follicular dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins and ovarian steroids in anoestrous Finnish Landrace ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 273-291.
- Blache D., M. Batailler and C. Fabre-Nys. 1994. Oestrogen receptors in the preoptic hypothalamic continuum: immunohistochemical study of the distribution and cell density during oestrous cycle in ovariectomized ewe. *J. Neuroendocrinol.* 6: 329-339.
- Bodensteiner K.J., C.M. Clay, C.L. Moeller and H.R. Sawyer. 1999. Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol. Reprod.* 60, 381-386.doi:10.1095/BIOLREPROD60.2.381
- Bodin L., E. Pasquale, S. Fabre, M. Bontoux, M. Morget, P. Persani and P. Mulsant. 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, 393-400.doi:10.1210/EN.2006-0764.
- Braw-Tal R., K.P. McNatty, P. Smith, D.A. Heath, N.L. Hudson, D.J. Phillips, B.J. McLeod and G.H. Davis. 1993. Ovaries of eweshomozygous for the X-linked Inverdale gene (FecX) are devoid of secondary and tertiary follicles but contain many abnormal structures. *Biol. Reprod.* 49, 895-907.
- Capote J., R. Fonseca y D. Benítez. 1990a. Algunos factores que influyen en el peso al nacer en el ovino Pelibuey y su relación con la mortalidad posnatal. En: VI Reunión Asoc. Cubana Prod. Anim. La Habana, Cuba.
- Caraty A., B. Delaleu, D. Chesneau and C. Fabre-Nys. 2002. Sequential role of E2 and GnRH for the expression of estrous behavior in ewes. *Endocrinology* 143: 139-145.
- Cárdenas S.J., C.J. Bonilla y Z.M. Valencia. 1987. Determinación de algunos factores que afectan la prolificidad en la oveja. *Memorias de la Reunio de Investigación Pecuaria en México, México D.F.*, pp 430
- Castillo R.H., Z.M. Valencia y J.M. Berruecos. 1972. Comportamiento reproductivo del borrego Tabasco mantenido en clima tropical y subtropical. I. Índices de Fertilidad. *Téc. Pecu. Méx.* 20:52-56.
- Chen Q, L. Pin, J.V. Jones, C.P.N. Cross, R.T. Silver and Y.L. Wang. 2007. Amplification refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain

- assay, for the detection of JAK2 V617 mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Journal of molecular diagnostics*, vol.9, No.2, April.
- Chu M.X., Z.H. Liu, C.L. Jiao, Y.Q. He, L. Fang, S.C. Ye, G.H. Chen and J.Y. Wang. 2006. Mutations in BMPR-IB and BMP15 genes are associated with litter size in Small Tailed Han Sheep (*Ovis aries*). *J. Anim. Sci*, 85: 598-603.
- Costa G., P. Fonseca, M. O. La, O. Ponce, J. Miranda, J. Vázquez, M. Miranda y J. Sánchez. 2000. Algunos factores que afectan el peso vivo al nacer en el ovino Criollo. En: V Congreso Iberoamericano de Razas Autóctonas y Criollas. La Habana, Cuba.
- Crow J.F. 1999. Hardy, Weinberg and language impediments. *Genetics*, 152(3): 821–5.
- Davis G.H. 2005. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*, 37, S11-S23.
- Davis G.H., J.C. McEwan, P.F. Fennessy, K.G. Dodds and P.A. Farquhar. 1991. Evidence for the presence of a gene influencing ovulation rate on the X chromosome of sheep. *Biol. Reprod.* 44, 620 Á/624.
- 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.
- Davis G.H., K.G. Dodds, R. Wheeler and N.P. Jay. 2001. Evidence that an imprinted gene on the X chromosome increases ovulation rate in sheep. *Biol. Reprod.*, 64: 216-221.
- Davis G.H., L. Balakrishnan, I.K. Ross, T. Wilson, S.M. Galloway and B.M. Lumsden. 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(1–2):87–96
- De Lucas T.J., R.M. Perez, F.O. Salvador y T.J. de Lucas. 2012. Parámetros reproductivos en ovinos de la raza Pelibuey. *SEOC 2012 PROD 252-O*. p. 386.
- Dickson L., H.G. Torres, R.D. Aubeterre y O. García. 2004. Factores que influyen en el intervalo entre partos y la prolificidad de un hato de carneros Pelibuey en Venezuela. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 38:13-17.
- Dieffenbach C.W., T.M.J. Lowe and G.S. Dveksler. 1995. General Concepts for PCR Primer Design. In: Dieffenbach, C.W, and Dveksler, G.S. (Eds.) *PCR Primer: a*

Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp. 133–155.

- Dong J., D.F. Albertini, K. Nishimori, T.R. Kumar, N. Lu and M.M. Matzuk. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383, 531-535. Doi:10.1038/383531A0
- Epping J.J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122, 829-838. doi:10.1530/REP.0.1220829.
- Epping J.J., K. Wigglesworth, F. Pendola and Y. Hirao. 1997. Murine oocyte suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biol. Reprod.* 56, 976-984. doi: 10.1095/BIOLREPROD56.4.976
- Evans A.C.O., P. Duffy, N. Hynes and M.P. Boland. 2000. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53: 699-715.
- Fabre S., A. Pierre, C. Pisselet, P. Mulsant, F. Lecert, 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, 435-444. doi:10.1677/JOE.0.1770435
- Fabre S., A. Pierre, P. Mulsant, L. Bodin, E. Di Pasquale, E. Persani, P. Monget, and D. Monniaux. 2006. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4, 20. doi:10.1186/1477-7827-4-20
- Fogarty N.M. 2009. A review of the effects of the Booroola gene (FecB) on sheep production. *Small Rum. Res.*, 85: 75-84
- Fonseca N., I. Ponce, P. Acosta, J. Vázquez, J. Sánchez and M. Miranda. 2000a. Uso de bancos de proteína con *L. leucocephala* en ovejas Pelibuey cubanas. En: I. Congreso Int. Mej. Anim. XXX Aniv. Centro Inv. Mej. Anim. La Habana, Cuba.
- Fortune J.E. 1994. Ovarian Follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction.* 50. 225-232.
- Galina, M.A., R., Morales, E., Silva y B. López. 1996. Reproductive performance of Pelibuey and Blackbelly sheep under tropical management systems in Mexico. *Small Ruminant Res.* 22:31-37.
- Gallegos-Sánchez J., P.P. Hernández y A. Albarrán. 1999. Neuroendocrinología del ciclo reproductivo de la oveja. En *Memorias del curso internacional en fisiología de la reproducción en rumiantes.* Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, México. pp. 1-26

- Galloway S.M., K.P. McNatty, L.M. Cambridge, M.P. Laitinen, J.L. Juengel, T.S. Jokiranta, R.J. McLaren, K. Luro, K.G. Dodds, G.W. Montgomery, A.E. Beattie, G.H. Davis and O. Ritvos. 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.doi:10.1038/77033.
- Galloway S.M., K.P. McNatty, L.M. Cambridge, M.P.E. Laitinen, J.L. Juengel, T.S. Jokiranta, R.J. McLaren, K. Luro, K.G. Dodds, G.W. Montgomery, A.E. Beattie, G.H. Davis and O. Ritvos. 2002. 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.
- Galloway S.M., V. Hanrahan, K.G. Dodds, M.D. Potts, A.M. Crawford and D.F. Hill. 1996. A linkage map of the ovine X chromosome. *Gen. Res.* 6, 667-677.
- Gilchrist R.B., L.J. Ritter and D.T. Armstrong. 2004. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 431-446. Doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2004.005.017.
- Gilchrist R.B., M. Lane and J.G. Thompson. 2008. Oocyte. secreted factors regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod. Update* 14, 159-177. Doi: 10.1093/HUMUPD/DMM040.
- Gonzalez-Reyna A., J. Valencia, W. Foote and B.D. Murphy. 1991. Hair sheep in Mexico: reproduction in the pelibuey sheep. *Anim. Breed. Abstr.*, 59: 509-524.
- Gupta V. and P.K. Sehajpal. 2003. Rapid detection of single nucleotide (-308) polymorphism in TNF- α promoter using ARMS-PCR. *Current Science.* Vol. 85, No. 11.
- Hafez E.S.E., y B. Hafez 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Foliculogénesis , maduración del ovulo y ovulación. Ed. 7ª, Editorial McGraw Hill. México. Pag. 70-83.
- Hanrahan JP., S.M. Gregan, P. Mulsant, M. Mullen, G.H. Davis, R. Powell and S.M. Galloway. 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, 900-909.
- Herrera H.J.G., C.F., Lemus y S.A. Barrera. 2003. Mejoramiento genético animal un enfoque aplicado. 1a. ed. Colegio de postgraduados, Estado de México; México. 151p.

- Hongcai S., J. Bai, Z. Niu, Muniresha, L. Fen and B. Jia. 2010. Study on candidate gene for fecundity traits in Xingjiang Cele black sheep. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(49), pp. 8498-8505, 6 December, 2010
- Hussein T.S., D.A. Froiland, F. Amato, J.G. Thompson and R.B. Gilchrist. 2005. Oocyte prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenetic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J. Cell Sci.* 118, 5257-5268. doi: 10.1242/JCS.02644
- Hyttel P., T. Fair, H. Callesen and T. Greve. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47, 23-32. doi:10.1016/S0093-691X(96)00336-6.
- Informe sobre la situacion de los recursos geneticos pecuarios (RGP) de México. 2012. www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Paginas/InfoRGPecuariosM.aspx
- Innis M.A., and D.H. Gelfand. 1994. Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (Eds.) *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. London: CRC Press, pp. 5–11.
- Jones A.V., S. Kreil, K. Zoi, K. Waghorn, C. Curtis, L. Zhang and J. Score. 2005. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*, Vol. 106, No.6.
- Juengel J.L. and K.P. McNatty. 2005. The role or proteins of transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum. Reprod. Update* 11, 143-160.
- Juengel J.L., L.J. Haydon, L. Still, P. Smith, N.L. Hudson and K.P. McNatty. 2007. Expression of mRNAs encoding factor in the germ line, alpha (FIG α) within the developing ovary and in small growing follicles in sheep. Abstract 115. In "Reproduction in Domestic Ruminants VI".(Eds J.L. Juengel, J.F. Murray and M.F. Smith) p. 565 (Nottingham University Press: Nottingham, UK.)
- Juengel J.L., N.L. Hudson, D.A. Heath, P. Smith, K.L. Reader, S.B. Lawrence, A.R. O'Connell, M.P.E. Laitinen, M. Cranfield, N.P. Groome, O. Ritvos and K.P. McNatty. 2002. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for follicular development in sheep. *Biol. Reprod.* 67, 1777-1789. doi:10.1095/BIOLREPROD.102.007146.
- Jurado J. J., A. Martinez-Royo and J. H. Calvo. 2008. Phenotypic effect of the BMP15/FecXR allele in prolificacy of the Carnes Oviaragon SCL population. *ITEA- Informacion Tecnica Economica Agraria* 104:149–154.

- Kadysky E. y E. León. 1984. Investigaciones sobre las cualidades económicas y las particularidades biológicas de las ovejas Criollas en la República de Cuba. (Mimeo) En: Memorias 1^{er} Seminario Nacional. Ovino. Inst. Inv. Jorge Dimitrov. Bayamo, Granma Cuba.
- Karhukorpi J., T. Laitinen, R. Karttunen and T. Anja. 2001. The functionally important IL-10 promoter polymorphism (-1082G →A) is not major genetic regulator in recurrent spontaneous abortions. *Molecular Human Reproduction*. Vol. 7, No.2: 201-203.
- Karsch F.J., J.M. Bowen, A. Caraty, N.P. Evans and S.M. Moenter. 1997. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol Reprod*. 56: 303-309.
- Lahoz C.B., J.L. Alabart, J. Folch, J.H. Calvo, A. Martínez-Royo y E. Fantova. 2011. Genes mayores para el incremento de la prolificidad. <http://hdl.handle.net/10532/1630>.
- Lahoz B., J.L. Alabart, J.I. Martí, E. Echegoyen, J.H. Calvo, A. Martínez-Royo, E. Vijil y J. Folch. 2009a. ¿Es necesario reducir la dosis de eCG en corderas prolíficas portadoras del alelo FecX^R (ROA)? Efecto de dos dosis diferentes sobre la fertilidad y prolificidad. XXXIV Congreso nacional de la sociedad española de ovinotecnia y caprinotecnia. Barbastro (Huesca) 16-19 de Septiembre. Actas del congreso p. 351-355.
- Lahoz B., M.E. Blasco, E. Sevilla, J. Folch, A. Roche, F.J. Quintín, A. Martínez-Royo, A.I. Galeote, J.H. Calvo, E. Fantova, J.J. Jurado y J.L. Alabart. 2009b. Fertility of select Rasa aragonesa rams carrying or not the FecX^R allele of BMP15 gene when used in artificial insemination. Wageningen Academic Pub. Book of Abstracts of the 60th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Barcelona, 24-27 Agosto. p. 278.
- Laviña G.A. 2012. Identificación de la deleción FecX^R del gen Ovino BMP15 en la raza Aragonesa: su implicación en la mejora genética de la prolificidad y su difusión en la cabaña ganadera. Tesis Doctoral. Farmacología y Fisiología. Departamento de Farmacología y Fisiología, Universidad de Zaragoza, Zaragoza España. Marzo.
- Laviña A., A. M. Macias, E. Martin, P. Arellano, S. Murillo, R. Ponz, L.V. Monteagudo, T. Tejedor, I. Sierra y E. Vijil. 2009. Analisis de la distribucion de partos de ovejas portadoras del alelo Fec X^f del gen BMP 15. SEOC 2009 Barbastro. pp. 408-412 (Premio mejor trabajo sección Genética).
- Legan J.S. and J.F. Karsch. 1979. Neuroendocrine regulation of the estrous cycle and seasonal breeding in the ewe. *Biol. Reprod*. 20: 74-85.

- Leon E. y V. Sotto. 1985. Crecimiento de los ovinos criollos cubanos en las actuales condiciones de producción. *Rev. Prod. Animal* 1:25, 1985.
- Li B., K. Ashwani, S. Vijay, S. Tejinder and M. Suthanthiran. 1999. TGF- β 1 DNA polymorphism protein levels and blood pressure. *American Heart Association. Hypertension*, Vol. 22; 271-275.
- Li R., R.J. Norman, D.T. Armstrong and R.B. Gilchrist. 2000. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol. Reprod.* 63, 839-845. doi:10.1095/BIOLREPROD63.3.839
- Lima T., J.L. Fuente, Pavón, Mayra y N. Perón. 1987. Influencia de varios factores en el peso al nacimiento y mortalidad de corderos Peli-buey. *Rev. Cub. Reprod. Anim.* 13(1): 55.
- Luna de H.G.M. 2009. Levantamiento de polimorfismos dos genes BMPR-1B e BMP-15 em ovinos das raças Santa Inês e Morada Nova do semi-árido nordestino brasileiro. Tese Doutorado em Ciência Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de medicina Veterinária. 59 f.: il. CDD 574.873 2
- Lundy T., P. Smith, A. O'Connell, N. L. Hudson and K.P. McNatty. 1999. Populations of granulosa cells in small follicles of sheep. *J. Reprod. Fertil* 115, 251-262. Doi: 10.1530/JRF.0.1150251
- Lush J.L. 1945. *Animal Breeding Plans*. 3th. Ed. ISU, Press, Ames, Iowa.
- Macedo, R. y A. Alvarado. 2005. Efecto de la época de monta sobre la productividad de ovejas Pelibuey bajo dos sistemas de alimentación en Colima, México. *Arch. Zootec.* 54:51-62.
- Macedo, R. y Y. Castellanos. 2004. Rentabilidad de un sistema intensivo de producción ovino en el trópico. *Avances de investigación agropecuaria*, 8;3:1-9.
- Martinez R.A., J.J., Jurado, J.P., Smulders, J.I., Martí, 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. doi:10.1111/J.1365-2052.2008.01707.X.
- McLeod B.J., S.E. Kyle, M.R. Ramsey and T.R. Manley. 1995. Hormone Secretion patterns associated with increased ovulation rates or with ovarian dysfunction in Inverdale (FecX) ewes. *Proc. NZ Soc. Animal Prod.* 55, 304 Á/306.

- McNatty K.P., L.G. Moore, N.L. Hudson, L.D. Quirke, S.B. Lawrence, K. Reade, J.P. Hanrahan, P. Smith, N.P. Groome, M. Laitinen, O. Ritvos and J.L. Juengel. 2004. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction* 128, 379-386. Doi: 10.1530/REP.1.00280
- McNatty K.P., N.L. Hudson, K.M. Henderson, S. Lun, D.A. Heath, M. Gibb, K. Ball, J.M. McDiarmid and D.C. Thurley. 1984. Changes in gonadotropin secretion and ovarian antral follicular activity in seasonally breeding sheep throughout the year. *J. Reprod. Fert.* 70: 309-321.
- McNatty K.P., N.L. Hudson, P. Smith and J.L. Juengel. 2006b. The effects of superovulating sheep with mutations in either the activina-like kinase (ALK6) or bone morphogenetic protein (BMP15) genes on ovulation rate and embryo production. *J.Reprod. Dev.* 52, S39-S43.
- McNatty K.P., S. Lawrence, N.P. Groome, M.F. Meerasahib, N.L. Hudson, L. Whiting, D.A. Heath and J.L. Juengel. 2006a. Oocyte signaling molecules and their effects on reproduction in ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 18, 403-412. Doi: 10.1071/RD05104.
- McNatty K.P., K. Reader, D.A. Heath and J. L. Juengel. 2007. Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin-dependent phase: a 2006 perspective. In 'Reproduction in Domestic Ruminants VI'. (Eds J. L. Juengel, J. F. Murray and M. F. Smith.) pp. 55–68. (Nottingham University Press: Nottingham, UK.)
- Mejía C.E., M. Rosales, J.E. Vargas and Murgeitio. Intensive production from African hair sheep fed sugar cane tops, multinutritional block and tree foliage. *Livestock Research for Rural Development* 1991 march [cited 2009 Nov 10]; 3 (1). Available from: <http://lrrd.cipav.org.co/lrrd3/1/mejia.htm>.
- Moller E.M., G. Bahnweg, Sandermann and H.H. H. & Geiger. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high-molecular-weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected-plant tissues. *Nucleic Acids Res.* 20: 6115-6116.
- Monteagudo L.V., R. Ponz, M.T. Tejedor, A. Laviña 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.
- Moradband F., G. Rahimi and M. Gholizadeh. 2011. Association of Polymorphisms in Fecundity Genes of GDF9, BMP15 and BMP15-1B with Litter Size in Iranian Baluchi Sheep. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 24, No. 9 : 1179 – 1183 September.
- Mullis K.B., and F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155: 335-350.

- Newton C.R., A. Graham, S.J. Powell, C. Summers, N. Kalsheker, J.C. Smith and A.F. Markham. 1989. Analysis of any point mutation in DNA, the amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acid Research*. Vol. 17, No.4
- Noel B., J.L. Bister and R. Paquay. 1993. Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J, Reprod. Fert.* 99: 695-700.
- Notter D.R. 2008. Genetic aspects of reproduction in sheep. *Reprod. Dom. Anim.*, 43: 122-128.
- Ohno S. 1973. Ancient linkage groups and frozen accidents. *Nature* 244, 256 Á /262.
- Padilla R.F.J., S.G.E. Mapes y K.F. Jiménez. 1988. Perfiles hormonales durante el ciclo estral de la oveja. *Técnica Pecuaria en México* 28: 96-108.
- Parker P.G., A.A. Snow, M.D. Schug, G.C. Booton and P.A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about population: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79:361-382
- Pérez C.R. 1987. Factores que influyen en la prolificidad de los ovinos tropicales. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
- Pérez R.E. 2012. Factor 9 de crecimiento asociado al índice de prolificidad en la oveja Pelibuey. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Texcoco, estado de México. 42p.
- Pérez C.R., C. Vázquez, F.C. Sosa, M. Valencia y P.E. González. 2005. Factores que influyen en la prolificidad en ovinos Pelibuey y Blackbelly. Memoria: XIX Reunión ALPA. Tampico, México.
- Peron N. 1991. El Ovino Pelibuey de Cuba Revisión Bibliográfica de Algunas Características Productivas. *Revista Mundial de Zootecnia*. <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/feedback/war/t8600b/t8600b0g.htm#TopOfPage>.
- Peron N. 2008. Crecimiento del ovino Pelibuey en Cuba. Revisión Bibliográfica. *Ciencia y Tecnología Ganadera* vol.2 No.3, p. 117-131.
- Pfaff D., M. Schwanzel-Fukuda, I. Parhar, A. Lauber, I. McCarty and I. Kow. 1994. GnRH neurons and other cellular and molecular mechanisms for simple mammalian reproductive behaviors. *Rec. Progr. Hormone Res.* 49: 1-25.
- Poblacion ganadera en cabezas de ovinos 2001-2010. www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pecuario/PobalcionGanadera/ProductoEspecie/ovino.pdf.

- Polley S, S. De, S. Batabyal, R. Kaushik, P. Yadav, J. Singh Arora, S. Chattopadhyay, S. Pan, B. Brahma, T. Kumar Datta and S.L. Goswami. 2009. Polymorphism of fecundity genes (BMPR1B, BMP15 and GDF9) in the Indian prolific Black Bengal goat. *Small Rumin Res.*, 85, 122-129.
- Produccion ovina, precio, valor y peso de gando en pie y carne en canal. 2011. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=373
- PRODUCCION, PRECIO, VALOR, ANIMALES SACRIFICADOS Y PESO. 2010. www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=369
- Ramírez A., Guerra, D. Garcés, Niurka y G. González. 1992a. Estudio de los rasgos de crecimiento pre-destete de ovinos Pelibuey. 1. Factores ambientales *Rev. Cub. Reprod. Anim. Número Especial*.
- Ravindra J.P. and N.C. Rawlings. 1997. Ovarian follicular dynamics in ewes during the transition from anoestrus to the breeding season. *J. Reprod. Fert.* 110: 279-289.
- Reineke A., Karlovsky and C.P.W. P. & Zebitz. 1998. Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. *InsectMol. Biol.* 7: 95-99
- Resumen Nacional Población Ganadera, Avícola y Apícola. 2001-2010. www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pecuario/PoblacionGanadera/Resumen/Resumen.pdf
- Rico C. y T. Planas. 1996. Nota sobre el peso al nacer de un rebaño mestizo Pelibuey. *Rev. Cubana. Cienc. Agric.* 30:19.
- Rico C., T. Planas, S. González y G. Febles. 2001. Tecnologías integrales para el mejoramiento de la productividad de ovejas Pelibuey en granjas genéticas. Informe Investigación. La Habana: Instituto de Ciencia Animal.
- Rojas R. O. y O.L.R. Rodriguez. 1995. Factores que modifican la prolificidad en ovejas BlacBelly en clima tropical. *Tec. Pecu. Mex.* Vol. 33 No.3.
- Rolfs A., I. Schuller, U. Finckh and I.W. Rolfs. 1992. PCR: clinical diagnostic and research. Springer- Verlag. Germany.
- Rolfs A., I. Schuller, U. Finckh and I. Weber-Rolfs. 1992. Substances affecting PCR: Inhibition and enhancement, 51-58. In: PCR: Clinical diagnostics and research, Springer.

- Sadighi M., K.J. Bodensteiner, A.E. Beattie and S.M. Galloway. 2002. Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Anim Genet*; 33:244-245.
- Saiki R.K., S.J. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350.
- Sambrook J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. In: Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (Eds.) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, chapter 6 y 14.
- SAS, Institute Inc. 2001. User's Guide: Statistics. The SAS system for windows. V8. Cary, NC, USA.
- Sawyer H.R. P., Smith, D.A. Heath, J.L. Juengel, St. J. Wakefield and K.P. McNatty. 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol. Reprod.* 66, 1134-1150. Doi: 10.1095/BIOLREPROD66.4.1134
- SCAI. 2013. Manual de Secuenciación. Universidad de Córdoba; España. 15p. <http://www.uco.es/servicios/scai/impresos/GEN/Manual%20de%20Secuenciacion.pdf>
- Scaramuzzi R.J., D.T. Baird, B.K. Campbell, M.A. Driancourt, J. Dupont, J.E. Fortune, R.B. Gilchrist, G.B. Martin, K.P. McNatty, A.S. McNeilly, P. Monget, D. Monniaux, C. Viñoles and R. Webb. 2011. Regulation of folliculogénesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 2011, 23, 444–467
- Scaramuzzi R.J., N.R. Adams, D.T. Baird, B.K. Campbell, J.A. Downing, J.K. Findlay, K.M. Henderson, G.B. Martin, K.P. McNatty, A.S. McNeilly and C.G. Tsonic. 1993. A model for follicle selection and determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, 459-478. doi:10.1071/RD9930459
- Segura J.C., L. Sarmiento y O. Rojas. 1996. Productivity of Pelibuey and Blackbelly ewes in Mexico under extensive management. *Small Ruminant Res* 21:57-62.
- 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 (FecX¹) on the X chromosome that influences ovulation rate. *Biol. Reprod.* 48, 1150 Á /1156.

- Shimasaki S., R.K. Moore, F. Otsuka and G.F. Erickson. 2004. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr. Rev.* 25, 72-101. doi:10.1210/ER.2003-0007.
- Simpson J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 60:73-76.
- Situación actual de México 2012. www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Programa%20Nacional%20Pecuario/Attachments/1/PNP260907.pdf
- Smith P., W.S. O, K.A. Corrigan, T. Smith, T. Lundy, G.H. Davis and K.P. McNatty. 1997. Ovarian morphology and endocrine characteristics of female sheep fetuses that are heterozygous or homozygous for the Inverdale prolificacy gene (FecX^l). *Biol.Reprod.* 57, 1183 Á /1192.
- Souza C.J., B.K. Campbell and D.T. Baird. 1997. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phase of the oestrous cycle. *Biol. Reprod.* 56, 483-488. doi:10.1095/BIOLREPROD56.2.483
- St. Primitivo T.F. 2001. La mejora genética animal en la segunda mitad del siglo XX. Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. León; España. *Arch. Zootec.* 50: 517-546. 2001.
- Testart J., A. Thebault, R. Frydman and E. Papiernik. 1982. Oocyte cumulus oophorus changes inside the human follicle cultured with gonadotrophins. In: Hafez ESE, Semm K, eds. *In-vitro Fertilization and Embryo Transfer*. Lancaster, England: MTP Press.
- Thibault C. 1977. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? *J. Reprod. Fertil.* 51, 1–15. doi:10.1530/JRF. 0.0510001
- Valadez E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Vierstraete A. 1999. Principio de la PCR. Universidad de Gante, Gante: Bélgica. <http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html>
- Ye S., S. Dhillon, X. Ke, A.R. Collins and I.N. Day. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 29, e88-e98.
- Zenteno B.G.G. 2009. Detección de la mutación T315I de ABL1, asociada a la resistencia a Imatinib, Dasatinib y Nilotinib en la Leucemia Mieloide Crónica. Tesis

Licenciatura. Ciencias Farmacéuticas. Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Escuela de Ciencias, Universidad de las Américas Puebla. Mayo.

10. ANEXOS

A1. Aptitud de producción (prolificidad)

El primer programa prol1, utilizó las variables: madre\$, para la identificación de las observaciones; year, año en que nacieron; ncam, numero de la cama, es decir, desde la toma de los registros diez partos atrás; tcam, tamaño de la camada, indica el tipo de parto simple, doble o triple.

```
data prol1;
input madre$ year ncam tcam;
if tcam=. then delete;
cards;
1      2003  1      .
"      "      "      "
380    2003  10     .
;
proc print;
proc sort; by madre;
proc means n mean; by madre; var ncam tcam;
proc means n mean; var ncam tcam;
run;
```

Una vez obtenido las tres variables necesarias (ncam, tcam y tcamreb) para aplicar el segundo programa (MPPA prol), el cual, obtuvo la mejor aptitud probable de producción (prolificidad), ajustando a los registros del rebaño de la siguiente manera:

```
data MPPA prol;
input madre$ ncam tcam;
n1= ncam*0.15;
n2= 1+(ncam-1)*0.15;
b= n1/n2;
```

```

tcamreb= 1.57;
propmadre= tcam/tcamreb;
h= 100+b*(propmadre-100);
cards;
1      6.67  1
"      "    "
380    6     1.4
;
proc sort; by h;
proc print;
run;

```

Donde $MPPA: \bar{H} - b_{y,x}(\bar{X} - \bar{H})$ se le asignaron valores de la siguiente manera:

\bar{H} = 100, para la expresión como razón o proporción de la característica de interés (prolificidad).

\bar{X} = promadre (prolificidad de la observación), obtenido de (tcam/tcamreb)

$b_{y,x}$ = n_1/n_2 , conseguido de $((ncam*0.15)/(1+(ncam-1)*0.15))$; 0.15, es repetibilidad o correlacion intraclase.

A2. Programación del termociclador para los polimorfismos FecX^G, FecX^L y FecX^H

Cuadro A2. Programación en el termociclador de los polimorfismos FecX^G, FecX^H y FecX^L.

Programación	FecX ^G	FecX ^L	FecX ^H
Tapa térmica	103°C	103°C	103°C
Tapa caliente antes del programa	si	Si	si
Tausa antes del programa	no	no	no
Desnaturalización inicial	04'00" 94°C	04'00" 94°C	04'00" 94°C
Arranque en caliente	impedido	Impedido	impedido
Número de ciclos	32	32	32
1er segmento	00'30" 94°C	00'30" 94°C	00'30" 94°C
2do segmento	00'30" 48°C	00'30" 55°C	00'30" 58°C
3er segmento	00'30" 72°C		00'30" 72°C
Extensión final	05'00" 72°C		05'00" 72°C
Mantenimiento Final	10°C		10°C

†Abreviacion de grados centígrados (°C), minutos (') y segundos (").

A3. Programación del termociclador para exón 1 y exón 2.

Cuadro A3. Programación en el termociclador para el exón 1 y exón 2 del gen BMP15.

Programación	Exón 1	Exon2
Tapa térmica	103°C	103°C
Tapa caliente antes del programa	si	si
Pausa antes del programa	no	no
Desnaturalización inicial	04'00" 94°C	04'00" 94°C
Arranque en caliente	impedido	impedido
Número de ciclos	32	32
1er segmento	01'00" 94°C	01'00" 94°C
2do segmento	00'50" 56°C	00'50" 58°C
3er segmento	01'30" 72°C	01'30" 72°C
Extensión final	07'00" 72°C	07'00" 72°C
Mantenimiento Final	10°C	10°C

†Abreviación de grados centígrados (°C), minutos (') y segundos (").