



**INFLUENCIA DE LA PRESINCRONIZACIÓN DEL ESTRO EN
VARIABLES REPRODUCTIVAS DE OVEJAS DE LA RAZA
KATAHDIN PORTADORAS DEL GEN *GDF9* †**

**[INFLUENCE OF ESTRUS PRE-SYNCHRONIZATION ON
REPRODUCTIVE VARIABLES IN KATAHDIN EWES CARRIERS
OF THE *GDF9* GENE]**

**Dante J. Hernández-Rubio¹, María del Carmen Navarro-Maldonado²,
Sergio S. González-Muñoz¹, Martha Hernández-Rodríguez¹,
Miguel P. Conde Hinojosa¹, and César Cortez-Romero^{1,3,*}**

¹*Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería. Carretera México-Texcoco km. 36.5, Montecillo, Texcoco, 56264, Estado de México, México. E-mail: ccortez@colpos.mx*

²*Departamento de Biología de la Reproducción. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco Núm. 186, Col. Leyes de Reforma IA Sección, Alcaldía Iztapalapa, C.P. 09310, Ciudad de México, México.*

³*Colegio de Postgraduados. Campus San Luis Potosí. Innovación en Manejo de Recursos Naturales. Iturbide No. 73, Salinas de Hidalgo, 78600, San Luis Potosí, México. E-mail: ccortez@colpos.mx*

**Corresponding author*

SUMMARY

Background: Genetic improvement in the sheep species focuses on increasing the number of offspring per sheep. Heritable characteristics such as ovulation rate, fertility, and prolificacy are desirable. **Objective:** To evaluate the influence of estrus pre-synchronization with PGF2 α on the manifestation of estrus, onset and return to estrus (1st and 2nd), pregnancy, lambing, prolificacy, and fertility in Katahdin ewes carrying exon 2 of the gene Factor Growth and Differentiation 9 (*GDF9*). **Methodology:** Seventy-two ewes were randomized into four treatments (T): T1 (n = 18), ewes without *GDF9* gene and without estrus pre-synchronization; T2 (n = 17), ewes without *GDF9* gene and with estrus pre-synchronization; T3 (n = 19) ewes with the *GDF9* gene and without estrus pre-synchronization, and T4 (n = 18), ewes with the *GDF9* gene and with estrus pre-synchronization. **Results:** The presence of estrus, the onset of estrus, and returns to estrus, pregnancy, and lambing percentages were not different between treatments (p>0.05). The average pregnancy and lambing in both cases were 86.2% and the average general prolificacy was 1.4 lambs per ewe for all four treatments. There were also no significant differences for the prolificacy or fertility rate (p>0.05). **Implications:** The present study contributes to the understanding of the use of presynchronization with PGF2 α and the effect of the presence of exon 2 of the *GDF9* gene on reproductive variables. **Conclusions:** The presynchronization of estrus with PGF2 α and the presence of exon 2 of the *GDF9* gene in ewes of the Katahdin breed did not have a significant effect on the reproductive variables evaluated.

Key words: fecundity gene; synchronization; estrus; prolificacy; ewe.

RESUMEN

Antecedentes: El mejoramiento genético en la especie ovina se enfoca en incrementar el número de crías por oveja. Para ello son deseables características heredables como tasa ovulatoria, fertilidad y prolificidad. **Objetivo:** Evaluar la influencia de la presincronización del estro con PGF2 α en la manifestación del estro, inicio y retornos al estro (1ro y 2do), gestación, parición, prolificidad y fecundidad en ovejas de la raza Katahdin portadoras del exón 2 del gen Factor de Crecimiento y Diferenciación 9 (*GDF9*). **Metodología:** Setenta y dos ovejas se asignaron al azar en cuatro tratamientos (T): T1 (n = 18), ovejas sin gen *GDF9* y sin presincronización del estro; T2 (n = 17), ovejas sin gen *GDF9* y con presincronización del estro; T3 (n = 19), ovejas con gen

† Submitted March 10, 2022 – Accepted January 1, 2023. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4269>



GDF9 y sin presincronización del estro y, T4 (n = 18), ovejas con gen *GDF9* y con presincronización del estro. **Resultados:** La presencia de estro, inicio al estro y retornos al estro, porcentajes de gestación y parto no fueron diferentes entre tratamientos ($p > 0.05$). El promedio de gestación y parición en ambos casos fue del 86.2% y la prolificidad general media fue de 1.4 corderos por oveja con los cuatro tratamientos. Tampoco hubo diferencias significativas para la tasa de prolificidad ni de fecundidad ($p > 0.05$). **Implicaciones:** El presente estudio contribuye a la comprensión del uso de la presincronización con *PGF2 α* y el efecto de la presencia del exón 2 del gen *GDF9* en variables reproductivas. **Conclusiones:** La presincronización del estro con *PGF2 α* y la presencia del exón 2 del gen *GDF9* en ovejas de la raza Katahdin no tuvieron un efecto significativo en las variables reproductivas evaluadas.

Palabras clave: gen de la fecundidad; sincronización; estro; prolificidad; oveja.

INTRODUCCIÓN

En México, la producción de corderos se considera una fuente importante de ingresos, para lo cual se han realizado estrategias con el fin de incrementar la rentabilidad de las unidades de producción (UP), mediante la introducción de razas de ovinos, que ayuden a mejorar las variables reproductivas (Chay-Canul, 2019). La introducción de razas como la Katahdin, permitió aumentar la habilidad materna, los pesos al nacimiento y al destete y, la velocidad de crecimiento, en comparación a la raza Pelibuey (Notter, 2000). Además, su capacidad para presentar ciclicidad a lo largo del año, la colocan como una alternativa de producción a nivel nacional (González-Godínez *et al.*, 2014). El control artificial de la época de empadre con hormonas exógenas, principalmente progesterona, prostaglandina, gonadotropina coriónica equina (eCG) y hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2020), minimizan las pérdidas económicas en las UP de ovinos (Mekuriaw *et al.*, 2016). La presincronización de estros con prostaglandinas *F2 α* (*PGF2 α*) mejora la tasa de concepción y la tasa de preñez, esto respalda la hipótesis de que un protocolo de presincronización con *PGF2 α* puede aumentar la fertilidad (Masoumi *et al.*, 2017). Vilariño *et al.* (2017) mencionan que la aplicación de dos dosis de *PGF2 α* en intervalo de 7 días, induce de forma eficaz la luteolisis, el estro y la ovulación en la mayoría de las hembras tratadas, y la ovulación se sincroniza en una ventana estrecha de 24 h. En la actualidad se utilizan diferentes métodos de sincronización del estro para aumentar la tasa ovulatoria (Habeeb y Anne Kutzler, 2021). La sincronización del estro aumenta la eficiencia de la inseminación artificial (IA), cuya finalidad es concentrar los partos; además permite una notable disminución en la mortalidad perinatal de los corderos (González-Bulnes *et al.*, 2020).

En paralelo a las técnicas de reproducción asistida, la genética molecular se ha convertido en una herramienta importante para generar avances en la producción, lo cual permite identificar y utilizar la

variación genómica para lograr la mejora genética, con la participación fisiológica de los genes, los cuales abarcan la caracterización a nivel molecular de los genomas completos o “Genómica” (Kona *et al.*, 2016). En algunas razas de ovinos se han identificado y caracterizado genes de la fecundidad, los cuales están relacionados con la tasa de ovulación y el tipo de parto; entre ellos se encuentran el Factor de Crecimiento y Diferenciación 9 (*GDF9*), la Proteína Morfogénica Ósea 15 (*BMP15*) y el Receptor de Proteína Morfogénica Ósea tipo 1B (*BMPR-1B*); miembros de la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante tipo Beta (TGF β ; Hanrahan *et al.*, 2004). El gen *GDF9* o FecG se encuentra en el cromosoma 5 de los ovinos (Sadighi *et al.*, 2002) y está formado por dos exones y separados por un intrón. El exón 1 tiene una longitud de 397 pb, mientras que el exón 2 tiene una longitud de 968 pb (Bodensteiner *et al.*, 1999). Este gen interviene en la proliferación y organización de las células de la teca que rodean al folículo (Strauss y Williams, 2019), participa en el crecimiento y desarrollo folicular en todas las etapas de la foliculogénesis, promueve la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa (Juengel *et al.*, 2013). Además, este gen tiene un efecto relevante en la tasa de ovulación y prolificidad (Silva *et al.*, 2011; Muñoz-García *et al.*, 2021), en el cual se han identificado cinco variantes genéticas o mutaciones (dominante o mutado, heterocigoto y recesivo o silvestre) en algunas razas de lana: alta fertilidad (Hanrahan *et al.*, 2004), Thoka islandesa (Nicol *et al.*, 2009), Vecaria (Souza *et al.*, 2014) y Finnsheep (Våge *et al.*, 2013; Mullen y Hanrahan 2014) y en razas de pelo: Embrapa o Santa Inés (Silva *et al.*, 2011). Por lo tanto, el uso de la presincronización del estro en presencia del gen *GDF9*, podría mejorar la respuesta en variables reproductivas. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la influencia de la presincronización del estro con *PGF2 α* en la manifestación del estro, inicio del estro, retornos al estro (1ro y 2do), gestación, parición, prolificidad y fecundidad en ovejas de la raza Katahdin portadoras del exón 2 del gen *GDF9*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

Este estudio se llevó a cabo de febrero a agosto del 2021, en la Unidad de Producción Agropecuaria “Quinta San Francisco”, ubicada en la localidad del Cerrito, municipio de Zempoala en el estado de Hidalgo, México (19° 54' 55" N, 98° 40' 05.27" O; altitud 2,456 m (García, 2004). El clima de este lugar es semiseco a templado con lluvias en verano, temperatura media anual de 14.3 °C y una precipitación anual de 494 mm (Prontuario de Información Geográfica Municipal, 2005).

Ovejas y manejo

Se utilizaron 72 ovejas de la raza Katahdin multíparas con registros individuales, de edad promedio de 5.1±1.1 años, 3±1.03 partos por oveja y una condición corporal promedio de 2.5, de acuerdo a la escala del 1 al 5 (Russel, 1984). Las ovejas se alimentaron con avena forrajera variedad Chihuahua (10.5% proteína cruda; Ramírez-Ordóñez *et al.*, 2013). Además, cada oveja recibió 300 g de alimento balanceado con 14 % de PC y 2.9 Mcal de EM kg⁻¹. Las ovejas tuvieron agua limpia a libre acceso durante el experimento. El manejo de las ovejas se realizó de acuerdo con los requerimientos Éticos para la Utilización de Animales en Experimentación, recomendados por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999; SAGARPA, 2001), sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio; en concordancia a las regulaciones para el uso y cuidado de animales de investigación, aprobado por el Consejo General Académico del Colegio de Postgraduados, México (COLPOS, 2019). Previo al experimento, las ovejas se desparasitaron vía subcutánea con una dosis de Ivermectina 0.2 mg kg⁻¹ de peso corporal y 50 mg de closantel (Laboratorios Aranda, México). Además, se suministró vía intramuscular 10,000 UI de vitamina A, 1,000 UI de vitamina D, 1 UI de vitamina E, 100 mg de vitamina B₁, 2 mg de vitamina B₂, 100 mg de vitamina B₃, 5 mg de vitamina B₅, 5 mg de vitamina B₆, 200 µg de vitamina B₁₂, 50 µg de vitamina H (RiverFarma, Ciudad de México). También, se aplicó bacterina contra las principales enfermedades respiratorias (2 mL de bacterina por oveja, Leucotoxoido, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad CENID-Microbiología, Instituto Nacional Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pesqueras-INIFAP) vía subcutánea.

Procesamiento de muestras para identificar el exón 2 del gen *GDF9*

Muestras de sangre de 72 ovejas de la raza Katahdin se recolectaron directamente de la vena yugular y se depositaron en tarjetas de Tecnología Asociada Flinders, por sus siglas en inglés FTA Whatman TM Elute Cards (GE Whatman, Maidstone, Kent, United Kingdom) de manera directa en un movimiento circular concéntrico dentro del área circular marcada; se colocaron <125 µL de sangre por pulgada del círculo en la tarjeta FTA (Dash *et al.*, 2020). Las tarjetas se secaron durante 30 min, se colocaron en sobres con etiquetas individuales y se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente para su análisis posterior.

En el laboratorio se purificó el ADN a partir de las tarjetas Whatman FTA. En cada tarjeta se realizó un corte aproximado de 1 mm de diámetro y ese trozo de tarjeta se introdujo en un tubo Eppendorf de 0.2 mL. Luego, en la fase de lavado se le agregaron 200 µL de reactivo de purificación FTA reagent por 5 min y el reactivo usado se desechó mediante decantación, todo lo cual se repitió tres veces. Después, al trozo de tarjeta se le agregaron 200 µL de amortiguador TE (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0) a 15° C por 5 min; de inmediato el amortiguador usado se desechó mediante decantación, lo cual se repitió dos veces. El exón 2 del gen *GDF9* se amplificó mediante la Reacción en Cadena de Polimerasa (por sus siglas en inglés PCR) y la mezcla de reacción para la PCR se elaboró a un volumen final de 12.5 µL, con 6.25 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2X (Promega® Madison, WI, E.U.A.), 0.625 µL de cada cebador (For-5'-GGAGAAAAGGGACAGAAGC-3' y Rev-5'-ACGACAGGTACTTAGT-3') reportados por Silva *et al.* (2011), más 5 µL de dihidrato de trehalosa al 10% (Merck® KGaA 64271, Darmstadt, Alemania). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial, 93 °C, 3 min, más 35 ciclos (desnaturalización, 93 °C, 40 s; alineamiento, 56 °C, 40 s; extensión, 72 °C, 40 s) y extensión final, 72 °C, 5 min. Los amplicones resultantes se separaron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% con un amortiguador de corrida TAE 1x Tris-Acetato-EDTA 1x (Merck® KGaA 64271, Darmstadt, Alemania), a un voltaje de 80 volts por 45 min; amortiguador de carga Loading Dye 6x y marcador molecular ΦX174 DNA-Hae III (New England BioLabs, MA, USA). El gel se tiñó con GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, SFO Bay Area, USA, un µL diluido en 99 µL de TAE 1X y se tomaron seis µL) que se añadió al gel de agarosa.

Y en cada pozo se depositaron tres μL del amplicon más tres μL de Green GoTaq® Flexi buffer (Promega®, Wisconsin, E.U.A.). Después, el gel se reveló en un fotodocumentador Equipar®, en el Laboratorio de Biología Molecular del Postgrado de Genética, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados.

Tratamientos

Las 72 ovejas Katahdin se distribuyeron al azar en cada uno de los cuatro tratamientos siguientes: T1 (n= 18), sin gen *GDF9* y sin presincronización; T2 (n= 17), sin gen *GDF9* y con presincronización; T3 (n= 19), con gen *GDF9* y sin presincronización; y T4 (n=18), con gen *GDF9* y con presincronización (Figura 1).

Presincronización y sincronización del estro

Con el fin de uniformizar el estro y la ovulación en las ovejas en los tratamientos T2 y T4, se realizó una presincronización del estro mediante, dos aplicaciones (a los 18 y a los 7 d previos del inicio de la sincronización con progestágeno) de 1 mL de prostaglandina- $\text{F}_{2\alpha}$ (250 μg de cloprostenol, MSD, Friesoythe, Alemania) vía intramuscular. Para la sincronización del estro en los cuatro tratamientos, se utilizó un dispositivo intravaginal impregnado de progesterona natural de liberación prolongada (CIDR, día cero, con 0.3 g de progesterona, Zoetis, Hamilton Nueva Zelanda) durante 9 d. En el día 7 se aplicó 1 mL de prostaglandina- $\text{F}_{2\alpha}$ (250 μg de cloprostenol, MSD, Friesoythe Alemania), más 300 UI de (eCG, Virbac, Buenos Aires, Argentina) vía intramuscular. En el día 9 se retiró el CIDR y 24 h después se administraron 100 μg de GnRH (MSD, Alemania) vía intramuscular.

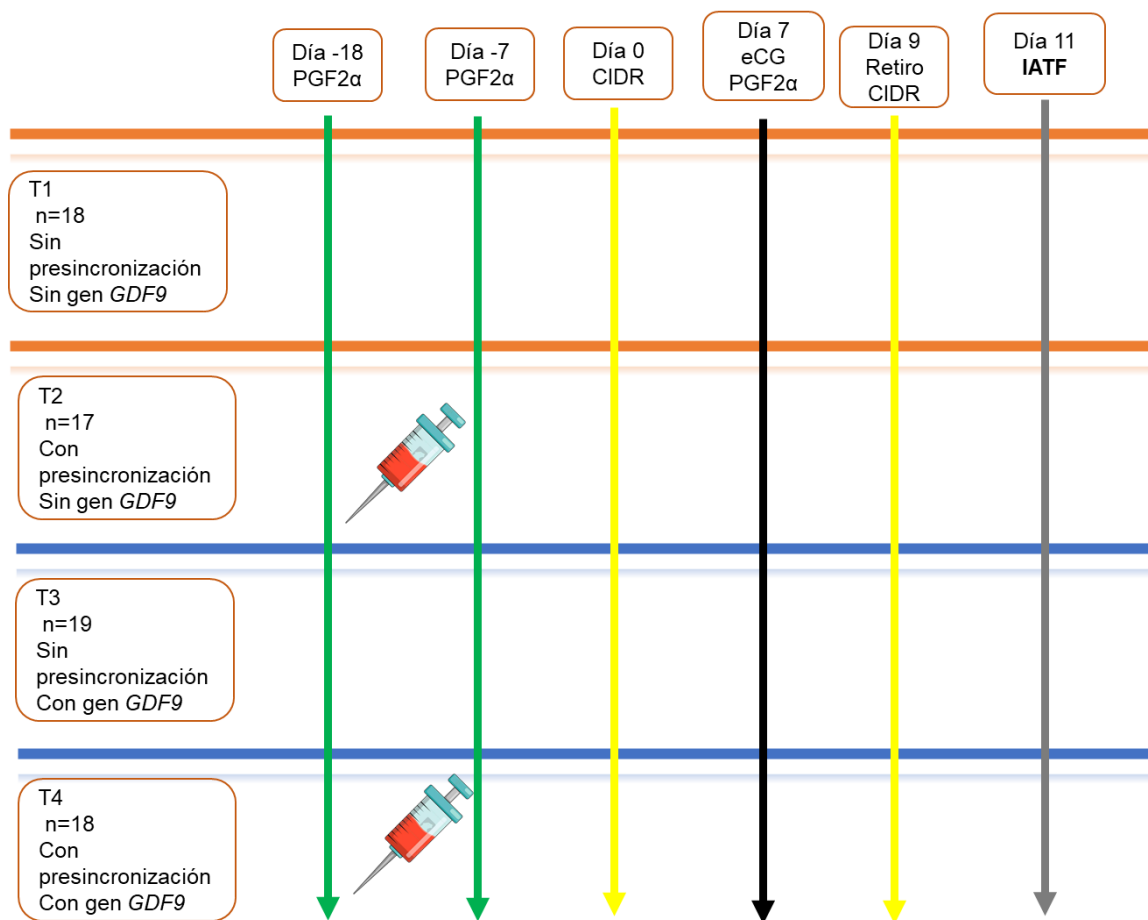


Figura 1. Protocolo de sincronización. Presincronización del estro; día -18, aplicación de PGF2 α (T2 y T4); y día -7, aplicación de PGF2 α (T2 y T4). Aplicación de CIDR; día 7, aplicación de eCG y PGF2 α ; día 9, retiro de CIDR; día 11, inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) a los cuatro tratamientos.

Manifestación e inicio del estro

La detección de estros se efectuó con un macho provisto de un mandil para evitar la cópula. El carnero se introdujo 12 h después del retiro del dispositivo y los estros se detectaron cada 6 h, separando a aquellas ovejas que presentaron estro para su posterior IA.

Inseminación artificial a tiempo fijo y detección de retornos a estro

La inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) se realizó 48 h después de retirar el dispositivo CIDR con semen fresco y refrigerado a una concentración de 1×10^6 espermatozoides por pajilla (0.25 mL), provenientes de carneros de la raza Katahdin saludables y aptos reproductivamente. La IATF se realizó por laparoscopia vía intrauterina (McKelvey *et al.*, 1985). Para ello, a las ovejas se les retiró el agua y la comida 24 h previo al servicio. Para tranquilizar a las ovejas se usó Xilacina al 2% (0.2 mg kg^{-1} de peso vivo, PiSA, México) vía intramuscular. Para evitar una posible infección, se aplicó una dosis de enrofloxacin 10% (5 mg kg^{-1} de peso vivo, Senosiain, México) y al concluir la IATF, se aplicó cicatrizante en cada una de las punciones realizadas con el trocar. La primera medición de los retornos al estro se realizó los días 15 al 19 después del retiro del CIDR en los cuatro tratamientos. La segunda medición de retorno al estro se efectuó los días 32 al 36 posteriores al retiro del CIDR en los cuatro tratamientos. Estas detecciones se hicieron en los corrales, con un carnero fértil provisto de pintura en el pecho para señalar las hembras en estro y equipados con un mandil para evitar la cópula de las ovejas, con 60 min por la mañana y 60 min por la tarde.

Diagnóstico de gestación, prolificidad y fecundidad

El diagnóstico de gestación se realizó 45 d después de la IATF mediante una ecografía con un ultrasonido (Shenzen Mindray Bio-medical electronics Co.9, Inc. UMS 900) de tiempo real de 3.5 Mhz y con una sonda convexa. El número de ovejas gestantes se registró respecto a las ovejas inseminadas y se confirmó al momento del parto con respecto a las ovejas diagnosticadas gestantes. Para la prolificidad, se contabilizó el número de corderos nacidos por cada oveja parida y para fecundidad se consideraron los corderos nacidos por el total de ovejas en el tratamiento.

Análisis estadístico

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial 2×2 (2 tratamientos, con gen y sin gen *GDF9* y 2 tratamientos con y sin presincronización). La variable de manifestación de estros se analizó mediante el modelo de regresión logística PROC-Logistic (SAS, 2013). La variable de inicio al estro se analizó con el método de curvas de sobrevivencia de Kaplan Meyer, mediante el procedimiento LifeTest. Las variables porcentaje de retornos a estro, porcentaje de gestación y porcentaje de parto o parición se analizaron con una distribución binomial, mediante el procedimiento GENMOD (SAS, 2013), presentados en medias \pm error estándar y la comparación de medias por Tukey. El índice de prolificidad y de fecundidad se analizaron mediante el procedimiento GENMOD (SAS, 2013) con distribución Poisson, mediante la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Las covariables peso y edad no fueron significativas ($p > 0.05$) en los modelos estadísticos usados; lo cual sugiere que no influyeron en la respuesta de los tratamientos utilizados. No se encontró significancia ($p > 0.05$) en las interacciones establecidas.

RESULTADOS

Presentación, inicio y retornos al estro

No hubo diferencias significativas entre los tratamientos para las variables presentación del estro y retornos a estro ($p > 0.05$; Tabla 1).

Tabla 1. Presencia de estros y retornos al estro en los cuatro tratamientos con ovejas de la raza Katahdin.

Tratamientos	n	Estro		1er retorno n (%)	2do retorno n (%)
		n	(%)		
T1	18	18	100	0	1 (5.6)
T2	19	16	84.2	0	1 (5.3)
T3	17	14	82.4	1 (5.3)	1 (5.3)
T4	18	17	94.4	0	0

T1 (n= 18), sin gen *GDF9* y sin presincronización con *PGF2 α* ; T2 (n= 17), sin gen *GDF9* y presincronización con *PGF2 α* ; T3 (n= 19), con gen *GDF9* y sin presincronización con *PGF2 α* ; y T4 (n=18), con gen *GDF9* y presincronización con *PGF2 α* . Se analizó mediante modelo de regresión logística PROC Logistic. No hubo diferencias significativas entre tratamientos (Tukey; $p > 0.05$), n = número de ovejas.

En la Figura 2 se muestra la distribución del inicio del estro en los cuatro tratamientos, con 39.1 ± 3.4 , 32.3 ± 4.7 , 29.2 ± 3.5 y 29.3 ± 2.7 h, para los tratamientos T1, T2, T3 y T4 ($p > 0.05$), respectivamente.

Porcentajes de gestación y parición

En los porcentajes de gestación y parto, se obtuvo un promedio de 86.2% para ambos casos; sin

embargo, no hubo diferencias entre tratamientos ($p > 0.05$; Tabla 2).

Tasa de prolificidad y fecundidad

La prolificidad general media fue de 1.4 corderos por oveja, pero no hubo diferencias significativas para la tasa de prolificidad ni para la tasa de fecundidad entre tratamientos ($p > 0.05$; Tabla 3).

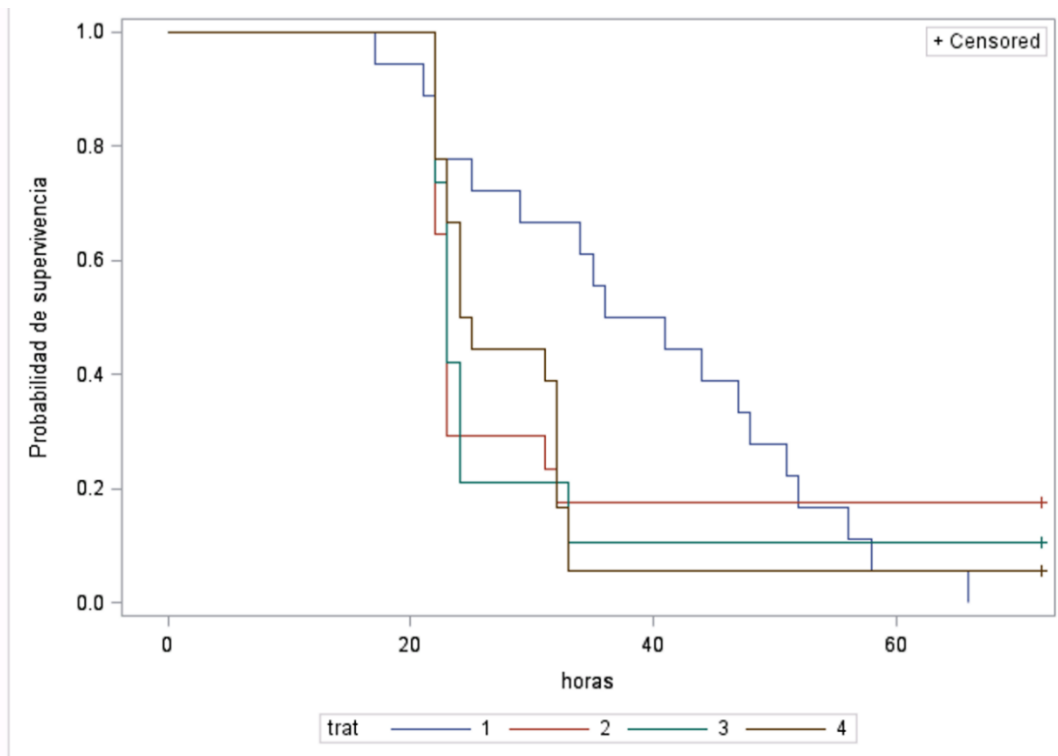


Figura 2. Curva de supervivencia para las horas (h) de inicio del estro de cada tratamiento, formadas por los estimadores de supervivencia de Kaplan-Meier a diferentes tiempos por tratamiento. T1: sin gen y sin presincronización (testigo); T2: sin gen y con presincronización T3: con gen y sin presincronización T4: con gen y con presincronización. Long Rank ($p=0.5305$).

Tabla 2. Porcentajes de gestación y parición en los cuatro tratamientos con ovejas de la raza Katahdin.

Tratamientos	n	Ovejas IATF	Gestación		Parición	
			n	%	n	%
T1	18	18	14	77.8	14	77.8
T2	19	16	13	81.3	13	81.3
T3	17	14	13	92.9	13	92.9
T4	18	17	16	94.1	16	94.1

T1 (n= 18), sin gen *GDF9* y sin presincronización con *PGF2 α* ; T2 (n= 17), sin gen *GDF9* y presincronización con *PGF2 α* ; T3 (n= 19), con gen *GDF9* y sin presincronización con *PGF2 α* ; y T4 (n=18), con gen *GDF9* y presincronización con *PGF2 α* . Se analizaron con una distribución binomial, mediante el procedimiento GENMOD de SAS y se presentan en medias \pm error estándar. No hay diferencia estadística (Tukey; $p > 0.05$). IATF: inseminación artificial a tiempo fijo, n = número de ovejas.

Tabla 3. Tasas de prolificidad y fecundidad en los cuatro tratamientos con ovejas de la raza Katahdin.

Tratamientos	n	Ovejas paridas (n)	Crías nacidas (n)	Prolificidad	Fecundidad
T1	18	14	20	1.4	1.1
T2	17	13	15	1.2	0.9
T3	19	13	21	1.6	1.1
T4	18	16	20	1.3	1.1

T1 (n= 18), sin gen *GDF9* y sin presincronización con PGF2 α ; T2 (n= 17), sin gen *GDF9* y presincronización con PGF2 α ; T3 (n= 19), con gen *GDF9* y sin presincronización con PGF2 α ; y T4 (n=18), con gen *GDF9* y presincronización con PGF2 α . Se analizaron mediante el procedimiento GENMOD de SAS con distribución Poisson. No hay diferencia estadística (Tukey; p>0.05). n = número de ovejas.

DISCUSIÓN

La inducción y sincronización del estro en todas las ovejas del estudio se realizó en el mes de marzo, considerado como el periodo de transición de la época reproductiva al anestro estacional (Gündoğan *et al.*, 2003). Según Besufkad *et al.* (2020), la manifestación del estro es la respuesta fisiológica a las aplicaciones de un análogo de prostaglandina o de progesterona (Fierro *et al.*, 2013), en diferentes momentos durante la fase lútea en ovejas con ciclos aleatorios. Las ovejas de la raza Katahdin utilizadas en este estudio tuvieron un valor promedio del 90.3% de estro en los cuatro tratamientos; resultado similar al 94.4% de estro reportado en ovejas Santa Inés y Black Belly de Barbados (Godfrey *et al.*, 1999), al 100% de estro en ovejas Pelibuey (Arroyo *et al.*, 2013) y al 84.2% en ovejas Awassi con dispositivos impregnados de progesterona (Swelum *et al.*, 2018). Cabe indicar que la sincronización del estro con el uso de análogos de prostaglandinas PGF2 α , tal como el cloprostenol, mejora la respuesta a la sincronización con estros más homogéneos (Alavez Ramírez *et al.*, 2014), pero la presincronización del estro con cloprostenol en los tratamientos T2 y T4 no favoreció significativamente la manifestación de estros en dichas ovejas. Esto posiblemente se debió a que el protocolo de base utilizado en los cuatro tratamientos con la combinación del progestágeno (CIDR), eCG y prostaglandina fue favorable a nivel de la respuesta del estro en todas las ovejas de los tratamientos utilizados; gracias al adecuado crecimiento y desarrollo folicular, a la sincronización y liberación del ovocito y la formación del cuerpo lúteo. En este contexto, Aké-López *et al.* (2015) reportan que el uso de hormonas exógenas sincronizan la fase lútea, además se favorece el inicio del estro (Yu *et al.*, 2020). Existe una gran cantidad de evidencia de que la progesterona lútea, además de regular la liberación de LH, puede controlar la secreción de FSH (Bartlewski *et al.*, 2017). Estos estudios indican que el protocolo de base utilizado en los

cuatro tratamientos en esta investigación favoreció el bajo número de ovejas en retorno a estro y el mayor porcentaje de gestación en todas las ovejas del estudio; por lo tanto, no se sugiere o se recomienda el uso de la presincronización de estros con PGF2 α en ovejas de la raza Katahdin.

El porcentaje promedio de gestación y parición en los cuatro tratamientos fue de 86.2% para ambas variables; sin embargo, no hubo diferencia entre los cuatro tratamientos del estudio. Al respecto, se han reportado resultados bajos de 68.4% en ovejas de la raza Awassi con un protocolo a 9 d e inseminadas a las 48 h del retiro del dispositivo en época reproductiva (Swelum *et al.*, 2018) y 60.42% en ovejas Malpura y Kheri en época de anestro (De *et al.*, 2015). Esta diferencia favorable en los resultados de porcentajes de gestación y parición en los cuatro tratamientos, aún en la época de transición, pudo deberse a que el uso de hormonas exógenas favoreció la formación de folículos preovulatorios para inducir y agrupar el estro, así como alcanzar una ovulación fértil (Martínez-Ros *et al.*, 2018). Por lo tanto, estos resultados indican que el uso de un protocolo combinado con progestágeno (CIDR), dosis de eCG (300 UI) y prostaglandinas PGF2 α en los cuatro tratamientos, provocó la aparición de estros sincronizados y un adecuado porcentaje de gestación en todas las ovejas, las cuales se inseminaron a tiempo fijo.

Por su parte, las tasas promedio de prolificidad y fecundidad fueron 1.4 y 1.05, respectivamente; sin diferencias significativas entre tratamientos; valores similares a lo reportado en ovejas de la raza Pelibuey (1.5; Aké-López *et al.*, 2015). Por su parte, Besufkad *et al.* (2020) reportaron una mejora en la prolificidad por efecto de la eCG, la cual contribuyó a un aumento de la tasa de ovulación en ovejas de la raza Menz. Sin embargo, se han reportado valores bajos con la variable prolificidad en ovejas Awassi con el uso de CIDR (1.0; Swelum *et al.*, 2018) y en ovejas Merino australiano al aplicar dos dosis de PGF2 α con 7 d de diferencia e IATF (1.0; Olivera-Muzante *et al.*, 2011). Por lo

tanto, el resultado uniforme de prolificidad en los cuatro tratamientos de este estudio, pudo deberse a que el uso de hormonas exógenas del protocolo combinado intervinieron y estimularon el crecimiento y la maduración folicular, con un efecto mayor en la estimulación de los folículos en crecimiento que permite una mayor ciclicidad en las ovejas tratadas (Aké-Villanueva *et al.*, 2017), lo cual brindó una nula diferencia significativa entre los cuatro tratamientos del estudio; pero permitió una mejora en las tasas de prolificidad y fecundidad de todas las ovejas, independientemente de la presincronización de estros con PGF2 α en los tratamientos T2 y T4.

Respecto a la influencia del control genético en variables reproductivas por los genes de la fecundidad, Muñoz-García *et al.* (2021) reportaron un efecto significativo en tasa de ovulación y tasa de prolificidad, pero no en las variables de manifestación del estro, retorno al estro, porcentajes de gestación y parición, en un grupo de ovejas Pelibuey portadoras de la variante mutada Embrapa (GG) con respecto al grupo silvestre (AA) y grupo sin gen (sG). Resultados similares se encontraron para la tasa ovulatoria con el grupo mutado o Embrapa (GG) en ovejas Santa Inés (Silva *et al.*, 2011). Con base en estos estudios, se explica que el exón 2 del gen *GDF9* no tuvo influencia en las variables reproductivas evaluadas, debido posiblemente a que solo las variantes genéticas mutadas que han sido identificadas en algunas razas en ovinos (alta fertilidad, Hanrahan *et al.*, 2004; Thoka islandesa, Nicol *et al.*, 2009; Vecaria, Souza *et al.*, 2014; Finnsheep, Våge *et al.*, 2013; Mullen y Hanrahan, 2014; Embrapa o Santa Inés, Silva *et al.*, 2011), tienen una relación con variables reproductivas y principalmente con tasa ovulatoria y prolificidad. Además, esto podría sugerir que las ovejas identificadas portadoras del exón 2 del gen *GDF9* posiblemente tenían el genotipo silvestre en la mayoría de ellas, lo cual no tuvo una influencia genética por el gen *GDF9* evaluado en las variables estudiadas. Quizá otros estudios con un mayor número de ovejas Katahdin, con su respectiva identificación de los grupos portadores de las variantes mutada, heterocigota y silvestre, podrían confirmar o brindar resultados que ayuden a vislumbrar realmente un efecto o control genético en protocolos de sincronización de estros, para así potencializar el uso de las biotecnologías reproductivas en programas de mejoramiento genético con ovinos.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados del presente estudio, se concluye que el uso de una presincronización de estros con PGF2 α y la presencia del exón 2 del gen *GDF9* no mejoraron la respuesta en la presencia de estro, inicio de estro, retornos a estros, porcentajes de gestación y parición, ni tasas de prolificidad y fecundidad en ovejas de la raza Katahdin.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento en los estudios de maestría del primer autor y a las Líneas de Generación y/o Aplicación del Conocimiento: Innovación Tecnológica y Seguridad Alimentaria en Ganadería (Campus Montecillo) y Manejo Sustentable de Recursos Naturales (Campus SLP), del Colegio de Postgraduados; así como al rancho “Quinta San Francisco” en el municipio de Zempoala, en el estado de Hidalgo, por facilitar las ovejas de la raza Katahdin para la realización del estudio.

Funding. The research was funded by Campus Montecillo of the Colegio de Postgraduados, México.

Conflict of interests. Nothing to declare.

Compliance with ethical standards. Animal management was done taking into account the ethical requirements for the use of animals in experimentation, recommended by the Mexican Official Norm (NOM-062-ZOO-1999) regarding technical specifications for the production, care, and use of laboratory animals in agreement with regulations for the use and care of research animals, approved by the General Academic Council of Colegio de Postgraduados, Mexico.

Data availability. Data is available with the first author Dante Josafet Hernández Rubio, dante_beef@hotmail.com upon reasonable request.

Author contribution statement (CRediT).

D.J. Hernández-Rubio - Investigation and writing - original draft preparation; **M.C. Navarro-Maldonado** - Data curation and validation; **S.S. González-Muñoz** - Writing – review & editing; **M. Hernández-Rodríguez** - Methodology; **M.P. Conde Hinojosa** - Formal analysis; **C. Cortez-Romero** - Conceptualization, project administration, resources, data curation, supervision and writing – review & editing.

REFERENCIAS

- Aké-López, J., Aké-Villanueva, J., Villanueva, N., Yerves, J. and Cuicas, R., 2015. Fertilidad y prolificidad de ovejas Pelibuey sincronizadas con esponjas intravaginales o implantes subcutáneos reciclados. *Bioagrociencias*, 8, pp. 44–49.
- Aké-Villanueva, J.R., Aké-López, J.R., Segura-Correa, J. C., Magaña-Monforte, J. G. and Aké-Villanueva, N. Y., 2017. Factors affecting conception rate of hair ewes after laparoscopic insemination with chilled semen under tropical conditions. *Small Ruminant Research*, 153, pp. 114–117.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.06.006>
- Alavez Ramírez, A., Arroyo Ledezma, J., Montes Pérez, R., Zamora Bustillos, R., Navarrete Sierra, L. F. and Magaña Sevilla, H., 2014. Short communication: Estrus synchronization using progestogens or cloprostenol in tropical hair sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 46(8), pp. 1515–1518.
<https://doi.org/10.1007/s11250-014-0660-z>
- Arroyo, J., Torre-Barrera, J. D. L. and Ávila-Serrano, N. Y., 2013. Reproductive response in hair sheep synchronized with progesterone or prostaglandins. *Agrociencia*, 47, pp. 661–670.
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952013000700003&script=sci_abstract&tlng=en
- Bartlewski, P. M., Sohal, J., Paravinja, V., Baby, T., Oliveira, M. E. F., Murawski, M., Schwarz, T., Zieba, D. A. and Keisler, D. H., 2017. Is progesterone the key regulatory factor behind ovulation rate in sheep? *Domestic Animal Endocrinology*, 58, pp. 30–38.
<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.06.006>
- Besufkad, S., Betsha, S., Demis, C., Zewude, T., Rouatbi, M., Getachew, T., Haile, A., Rischkowsky, B. and Rekik, M., 2020. Field synchronization of Ethiopian Highland sheep for fixed time artificial insemination: Improvement of conception rate with a double injection of prostaglandin at 11 days. *Journal of Applied Animal Research*, 48(1), pp. 413–418.
<https://doi.org/10.1080/09712119.2020.1815752>
- Bodensteiner, K. J., Clay, C. M., Moeller, C. L. and Sawyer, H. R., 1999. Molecular Cloning of the Ovine Growth/Differentiation Factor-9 Gene and Expression of Growth/Differentiation Factor-9 in Ovine and Bovine Ovaries1. *Biology of Reproduction*, 60(2), pp. 381–386.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod60.2.381>
- Chay-Canul, A. J., 2019. Productividad de ovejas Pelibuey y Katahdin en el trópico húmedo. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 6(16), pp. 159–165.
<https://doi.org/10.19136/era.a6n16.1872>
- COLPOS (Colegio de Postgraduados). Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la investigación en el Colegio de Postgraduados. Dirección de Investigación: Colegio de Posgraduados, México, 2019.
https://www.colpos.mx/wb_pdf/norma_interna/reglamento_usoycuidadoanimales_050819.pdf
- Dash, H. R., Shrivastava, P. and Das, S., 2020. *Principles and practices of DNA analysis: A laboratory manual for forensic DNA typing*. Humana Press.
<https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-0716-0274-4>
- De, K., Kumar, D., Sethi, D., Gulyani, R. and Naqvi, S. M. K., 2015. Estrus synchronization and fixed-time artificial insemination in sheep under field conditions of a semi-arid tropical region. *Tropical Animal Health and Production*, 47(2), pp. 469–472.
<https://doi.org/10.1007/s11250-014-0735-x>
- Fierro, S., Gil, J., Viñoles, C. and Olivera-Muzante, J., 2013. The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. *Theriogenology*, 79(3), pp. 399–408.

- <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.022>
- García, E., 2004. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen: Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana* (Quinta, Vol. 1–cinco). Universidad Autónoma de México.
<http://www.publicaciones.igg.unam.mx/index.php/ig/catalog/book/83>
- Godfrey, R. W., Collins, J. R., Hensley, E. L. and Wheaton, J. E., 1999. Estrus synchronization and artificial insemination of hair sheep ewes in the tropics. *Theriogenology*, 51(5), pp. 985–997. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00044-8)
- Gonzalez-Bulnes, A., Menchaca, A., Martin, G. B., and Martinez-Ros, P., 2020. Seventy years of progestagen treatments for management of the sheep oestrous cycle: Where we are and where we should go. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(5), pp. 441.
<https://doi.org/10.1071/RD18477>
- González-Godínez, A., Urrutia-Morales, J., and Gámez-Vázquez, H. G., 2014. *Comportamiento reproductivo de ovejas Dorper y Katahdin empadradas en primavera en el norte de México*. pp. 123–127.
<https://www.redalyc.org/pdf/939/93930735010.pdf>
- Gündoğan, M., Baki, D. and Yeni, D., 2003. Reproductive Seasonality in Sheep. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science*, 53(4), pp. 175–179.
<https://doi.org/10.1080/09064700310014960>
- Habeeb, H. M. H. and Anne Kutzler, M., 2021. Estrus Synchronization in the Sheep and Goat. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 37(1), 125–137.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.10.007>
- Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R. and Galloway, S. M., 2004. Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*)1. *Biology of Reproduction*, 70(4), pp. 900–909.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023093>
- Juengel, J. L., Davis, G. H. and McNatty, K. P., 2013. Using sheep lines with mutations in single genes to better understand ovarian function. *Reproduction*, 146(4), pp. R111–R123.
<https://doi.org/10.1530/REP-12-0509>
- Kona, S. S. R., Praveen Chakravarthi, V., Siva Kumar, A. V. N., Srividya, D., Padmaja, K. and Rao, V. H., 2016. Quantitative expression patterns of GDF9 and BMP15 genes in sheep ovarian follicles grown in vivo or cultured in vitro. *Theriogenology*, 85(2), pp. 315–322.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.022>
- Martínez-Ros, P., Rios-Abellan, A. and Gonzalez-Bulnes, A., 2018. Influence of Progesterone-Treatment Length and eCG Administration on Appearance of Estrus Behavior, Ovulatory Success and Fertility in Sheep. *Animals*, 9(1), pp. 9.
<https://doi.org/10.3390/ani9010009>
- Masoumi, R., Badiei, A., Shahneh, A. Z., Kohram, H., Dirandeh, E. and Colazo, M. G., 2017. A Short Presynchronization with PGF2 α and GnRH Improves Ovarian Response and Fertility in Lactating Holstein Cows Subjected to a Heatsynch Protocol. *Annals of Animal Science*, 17(1), pp. 169–177. <https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0044>
- McKelvey, W. A. C., Robinson, J. J., Aitken, R. P. and Henderson, G., 1985. The evaluation of a laparoscopic insemination technique in ewes. *Theriogenology*, 24(5), pp. 519–535. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(85\)90059-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(85)90059-7)
- Mekuriaw, Z., Assefa, H., Tegegne, A. and Muluneh, D., 2016. Estrus response and fertility of Menz and crossbred ewes to

- single prostaglandin injection protocol. *Tropical Animal Health and Production*, 48(1), pp. 53–57. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0919-z>
- Muñoz-García, C., Vaquera-Huerta, H., Gallegos-Sánchez, J., Becerril-Pérez, C. M., Tarango-Arámbula, L. A., Bravo-Vinaja, Á. and Cortez-Romero, C., 2021. Influence of FecG^E mutation on the reproductive variables of Pelibuey ewes in the anestrus period. *Tropical Animal Health and Production*, 53(2), pp. 328. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02755-7>
- Mullen, M. P. and Hanrahan, J. P., 2014. Direct evidence on the contribution of a missense mutation in GDF9 to variation in ovulation rate of Finnsheep. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095251>
- Nicol, L., Bishop, S. C., Pong-Wong, R., Bendixen, C., Holm, L.-E., Rhind, S. M. and McNeilly, A. S., 2009. Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte-specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *Reproduction*, 138(6), pp. 921–933. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0193>
- Notter, D. R., 2000. Potential for Hair Sheep in the United States. *Journal of Animal Science*, 77(E-Suppl), pp. 1. <https://doi.org/10.2527/jas2000.77E-Suppl1h>
- Olivera-Muzante, J., Gil, J., Fierro, S., Menchaca, A. and Rubianes, E., 2011. Alternatives to improve a prostaglandin-based protocol for timed artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, 76(8), pp. 1501–1507. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.020>
- Prontuario de Información Geográfica Municipal., 2005. 3, 9. [http://www.cegaipslp.org.mx/HV2020Docs.nsf/nombre_de_la_vista/8E2BFADF99CFFBAA86258613006ED2E3/\\$File/prontuario.pdf](http://www.cegaipslp.org.mx/HV2020Docs.nsf/nombre_de_la_vista/8E2BFADF99CFFBAA86258613006ED2E3/$File/prontuario.pdf)
- Ramírez-Ordóñez, S., Domínguez-Díaz, D., Salmerón-Zamora, J. J. and Villalobos-Villalobos, G., 2013. *Producción y calidad del forraje de variedades de avena en función del sistema de siembra y de la etapa de madurez al corte*. 36, 9. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000400005
- Russel, A., 1984. Body condition scoring of sheep. *In Practice*, 6(3), pp. 91–93. <https://doi.org/10.1136/inpract.6.3.91>
- Sadighi, M., Bodensteiner, K. J., Beattie, A. E. and Galloway, S. M., 2002. Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Animal Genetics*, 33(3), pp. 244–245. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2002.t01-11-00876.x>
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca, y Alimentación.), 2001. Norma oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de La Federación*, 22 Agosto, pp. 107–165. Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf
- SAS Institute Inc., Cary, NC, U., 2013. *SAS 9.4 Statements* ®. (S. Institute, Ed.) (9.4 Statem).
- Silva, B. D. M., Castro, E. A., Souza, C. J. H., Paiva, S. R., Sartori, R., Franco, M. M., Azevedo, H. C., Silva, T. A. S. N., Vieira, A. M. C., Neves, J. P. and Melo, E. O., 2011. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep: New polymorphism in GDF9 and prolificacy. *Animal Genetics*, 42(1), pp. 89–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02078.x>
- Souza, C. J. H., McNeilly, A. S., Benavides, M. V., Melo, E. O. and Moraes, J. C. F., 2014. Mutation in the protease cleavage site of GDF9 increases ovulation rate and litter

- size in heterozygous ewes and causes infertility in homozygous ewes. *Animal Genetics*, 45(5), pp. 732–739. <https://doi.org/10.1111/age.12190>
- Strauss, J. F. and Williams, C. J., 2019. Ovarian Life Cycle. En *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology* pp. 167-205.e9. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00008-1>
- Swelum, A. A.-A., Saadeldin, I. M., Moumen, A. F., Ali, M. A. and Alowaimer, A. N., 2018. Efficacy of controlled internal drug release (CIDR) treatment durations on the reproductive performance, hormone profiles, and economic profit of Awassi ewes. *Small Ruminant Research*, 166, pp. 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.07.018>
- Våge, D. I., Husdal, M., Kent, M. P., Klemetsdal, G. and Boman, I. A., 2013. A missense mutation in growth differentiation factor 9 (*GDF9*) is strongly associated with litter size in sheep. *BMC Genetics*, 14(1), pp. 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-1>
- Vilariño, M., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P. C., García-Pintos, C. and Menchaca, A., 2017. Time of ovulation and pregnancy outcomes obtained with the prostaglandin-based protocol Synchrovine for FTAI in sheep. *Theriogenology*, 90, pp. 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.003>
- Yu, H., Wang, Y., Wang, M., Liu, Y., Cheng, J. and Zhang, Q., 2020. Growth differentiation factor 9 (*gdf9*) and bone morphogenetic protein 15 (*bmp15*) are potential intraovarian regulators of steroidogenesis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *General and Comparative Endocrinology*, 297, 113547. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113547>