



Gonadotropina coriónica equina y gen *GDF9* en el comportamiento reproductivo de ovejas raza Katahdin

Reyna Sánchez-Ramos¹ ; José Antonio Hernández-Marín² ; Jorge Alberto Ortiz-Salazar³ ; Genaro Olmos-Oropeza⁴ ; César Cortez-Romero^{1,4*} .

¹Colegio de Postgraduados, Recursos Genéticos y Productividad- Ganadería. Campus Montecillo, Estado de México, México.
²Universidad de Guanajuato, Departamento de Veterinaria y Zootecnia, División de Ciencias de la Vida. Campus Irapuato-Salamanca, Irapuato, Guanajuato, México.

³Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Bermejillo, Durango, México.

⁴Colegio de Postgraduados, Innovación en Manejo de Recursos Naturales. Campus San Luis Potosí, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, México.

*Correspondencia: ccortez@colpos.mx

Recibido: Junio 2022; Aceptado: Octubre 2022; Publicado: Octubre 2022.

RESUMEN

Objetivo. Determinar la influencia de la aplicación de gonadotropina coriónica equina (eCG) y la presencia del exón 2 del gen *GDF9* en variables reproductivas en ovejas de la raza Katahdin en época de transición. **Materiales y métodos.** Se utilizaron 63 ovejas con edad y peso promedio de 2.83 ± 0.89 años y 45.32 ± 5.44 kg, respectivamente. Se usó un arreglo factorial 2x2 bajo un diseño completamente al azar, donde los factores y niveles fueron: la ausencia o presencia del exón 2 del gen *GDF9* y la aplicación o no de la hormona eCG en el protocolo de sincronización. **Resultados.** La aplicación de eCG mostró un efecto significativo favorable en el comportamiento reproductivo de las ovejas, no así para la presencia del exón 2 del gen *GDF9*. Los tratamientos T2 y T4 fueron superiores en las variables % de gestación, % de parición, fecundidad y prolificidad con respecto a T1 y T3. La mejor respuesta reproductiva se obtuvo con la aplicación de eCG independiente de la presencia o ausencia del gen. **Conclusiones.** Este estudio muestra evidencia de la nula interacción del exón 2 del gen *GDF9* y la eCG para mejorar el rendimiento reproductivo de ovejas raza Kathadin. Se recomienda la aplicación de eCG en protocolos de sincronización de estros para ovejas de la raza Kathadin en época de transición. Frente a los pocos reportes genómicos en la raza, se muestra evidencia de la necesidad para realizar otras investigaciones de las variantes genéticas y su relación con la reproducción en ovejas.

Palabras clave: Estro; exón; fecundidad; gen; gonadotropina; ovinos; prolificidad (*Fuente: USDA, ICYT biología animal*).

ABSTRACT

Objective. To determine the influence of equine chorionic gonadotropin (eCG) application and the presence of exon 2 of the *GDF9* gene on reproductive variables in Katahdin sheep in the transition period. **Materials and methods.** 63 sheep with average age and weight of 2.83 ± 0.89 years and 45.32 ± 5.44 kg, respectively, were used. A 2x2 factorial arrangement under a completely randomized

Como citar (Vancouver).

Sánchez-Ramos R, Hernández-Marín JA, Ortiz-Salazar JA, Olmos-Oropeza G, Cortez-Romero C. Gonadotropina coriónica equina (eCG) y gen *GDF9* en el comportamiento reproductivo de ovejas raza Katahdin. Rev MVZ Córdoba. 2022; 27(Supl):e2888. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2888>



©El (los) autor (es) 2022. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

design was used, where the factors and levels were: the absence or presence of exon 2 of the *GDF9* gene and the application or not of the eCG hormone in the synchronization protocol. **Results.** The application of eCG showed a significant favorable effect on the reproductive behavior of sheep, but not for the presence of exon 2 of the *GDF9* gene. Treatments T2 and T4 were superior in the variables % of gestation, % of lambing, fertility and prolificacy with respect to T1 and T3. The best reproductive response was obtained with the application of eCG regardless of the presence or absence of the gene. **Conclusions.** This study shows evidence of the null interaction of exon 2 of the *GDF9* gene and eCG to improve the reproductive performance of Katahdin sheep. The application of eCG is recommended in estrus synchronization protocols for Katahdin sheep in the transition period. Faced with the few genomic reports on Katahdin ewes, evidence is shown of the need to carry out other research on genetic variants and their relationship with reproduction in sheep.

Keywords: Estrus; exon; fertility; gene; gonadotropin; sheep; prolificacy (Source: *USDA, ICYT animal biology*).

INTRODUCCIÓN

La producción de ovinos es importante en las regiones centro y sureste de México. A pesar de que en los últimos años la cantidad de carne de ovino producida ha incrementado, no cubre la demanda nacional; por lo que ha sido necesario importar carne de otros países como Nueva Zelanda y Estados Unidos (1,2). La ovinocultura es una fuente importante de recursos y alimento para productores con ingresos bajos que cuentan con parcelas pequeñas, forrajes de baja calidad (3,4), huertos frutales y que realizan actividades silvopastoriles (2). Los factores nutricionales, genéticos y reproductivos son clave en la producción animal eficiente. En particular, un manejo reproductivo adecuado con protocolos de sincronización del estro es indispensable para obtener una tasa de parición y destete sobresalientes (5). En ovejas, el uso de hormonas exógenas en protocolos de sincronización permite controlar la presencia de estros y la tasa de gestación en épocas reproductivas y no reproductivas.

La progesterona (P_4) impregnada en el dispositivo intravaginal de liberación controlada (Control Internal Drug Release, CIDR) es usada para la sincronización de estros, apoyada con la aplicación de prostaglandinas (PG) para provocar lisis del cuerpo lúteo en ovejas cíclicas (5). Además, para obtener mayor prolificidad (6), los protocolos se complementan con la aplicación de eCG, que a su vez favorece el crecimiento y desarrollo folicular, y la actividad esteroidogénica (7). Asimismo, los tratamientos con la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) al final de los protocolos, mejora la ovulación y la tasa de gestación (5,8).

En adición a los protocolos de sincronización en ovejas, han surgido nuevas biotecnologías para mejorar su comportamiento reproductivo. El desarrollo de herramientas de biología molecular y genómica han sido clave en el mejoramiento genético para características reproductivas en los ovinos (9). En particular, se ha puesto interés en la oveja de la raza Katahdin para la mejora reproductiva, ya que esta destaca por sus cualidades reproductivas similares a las de la raza Pelibuey como son habilidad materna y buena prolificidad (10). La fertilidad de 1.8 partos al año y la buena producción de leche para amamantar a sus crías (hasta 3 corderos) son características de la raza Katahdin (3).

Se han identificado genes y mutaciones asociadas con prolificidad y fecundidad de ovejas (11). Estos son llamados genes de la fecundidad: el factor de crecimiento y diferenciación 9 (*GDF9*; compuesto por los exones 1 y 2, y un intrón), la Proteína Morfogénica Ósea 15 (*BMP15*) y el receptor de la Proteína Morfogénica Ósea tipo 1B (*BMPRI1B*); pertenecientes a la familia del Factor de Crecimiento Transformante tipo β (*TGF β*) (12,13). En particular, para el gen *GDF9* (14) se reporta que tiene efecto directo en las funciones del eje hipotálamo-adenohipofisario-ovarios, en la proliferación y organización de las células de la teca (15), en la foliculogénesis y en la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa (16). Se han identificado cinco variantes genéticas o mutaciones (dominante o mutado, heterocigoto y recesivo o silvestre) en el exón 2 del gen *GDF9* en algunas razas de ovinos de lana, como: alta fertilidad (*FecG^H*), (12), Thoka islandesa (*FecG^T*) (17), Vecaria (*FecG^V*) (18) y Finnsheep (*FecG^{NWS}* o *FecG^F*) (19,20) y en razas de pelo como Santa Inés (Embrapa o *FecG^E*) (21), con efecto positivo

en variables reproductivas; en particular, el genotipo GG de dicha variante Embrapa o *FecGE* en el exón 2 se reportó con efecto significativo en la tasa de ovulación y la prolificidad de ovejas de pelo (21,22).

El conocimiento de la influencia y evaluación de los genes de la fecundidad promueve la aplicación de estrategias de mejoramiento genético en los ovinos y la eventual mejora de la tasa de ovulación, parición y prolificidad. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar la influencia de la aplicación de eCG y la presencia del exón 2 del gen *GDF9* en las variables sincronización y retorno a estro, porcentaje de gestación y parición, índice de prolificidad y fecundidad en ovejas de la raza Katahdin en etapa de transición de la época reproductiva al anestro estacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. La investigación se realizó durante los meses de febrero a agosto de 2020, en la localidad de Zempoala, en Hidalgo, México; con coordenadas 19°54'56" N, 98°40'12" O y altitud de 2500 m (23). Lugar con clima templado-frío, temperatura media anual de 14.3°C, precipitación promedio anual de 494 mm con período de lluvias de junio-septiembre (24). La fase de laboratorio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Genética, ubicado en el Colegio de Postgraduados campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

Animales. Se utilizaron 63 ovejas de la raza Katahdin con edad promedio de 2.83 ± 0.89 años, con registros de 1.97 ± 0.88 partos promedio consecutivos, y peso promedio de 45.32 ± 5.44 kg. Se seleccionaron 32 ovejas portadoras del exón 2 del gen *GDF9* y 31 ovejas no portadoras. Las ovejas seleccionadas eran sanas y con una condición corporal de 3 a 3.5, de acuerdo con la escala 1 a 5 (25). Todos los animales se desparasitaron vía intramuscular con levamisol vitaminado (L-Vermizol® Vitaminado al 12%, Laboratorio Aranda, México) y dosis de 1 mL 24 kg^{-1} de peso. Las ovejas se mantuvieron estabuladas en diferentes corrales de acuerdo con el tratamiento asignado y se alimentaron con dietas isoenergéticas formuladas para cubrir los requerimientos de mantenimiento, 9.5% de proteína cruda al día y $419 \text{ kJ kg}^{-1} \text{ PC}^{0.75}$ (26), más un *flushing* con 0.32 kg de concentrado (Borrega Plus®, 15% Proteína cruda y 2.4 de Mcal por kg) por oveja durante 24 días; 15 días

previos y 9 días durante la sincronización; con acceso *ad libitum* de agua limpia y fresca.

Toma de muestras sanguíneas. Para la identificación del exón 2 del gen *GDF9*, se recolectaron 3 mL de sangre por punción de la vena yugular de cada oveja con jeringas estériles, bajo los criterios de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (27) sobre especificaciones técnicas, para la producción cuidado y uso de animales de laboratorio, de acuerdo con las regulaciones para el uso y cuidado de animales de investigación, aprobado por el Consejo General Académico del Colegio de Postgraduados, México (28). Se colocaron 0.5 mL de la sangre recolectada en minitarjetas Whatman™ FTA™ (por sus siglas en inglés, Flinders Technology Associates; WB 120055, GE Healthcare®, Reino Unido). Las tarjetas se secaron a la sombra y se conservaron a temperatura ambiente, según las especificaciones del fabricante, hasta su procesamiento en laboratorio.

Purificación del DNA y amplificación del gen *GDF9*. En la purificación del DNA, se realizaron cortes de aproximadamente 1 mm² de la minitarjeta Whatman FTA impregnada con sangre y se depositaron en un tubo Eppendorf de 0.2 mL. Enseguida, se realizaron tres lavados con 200 µL del reactivo de purificación FTA (GE Healthcare®, Reino Unido) a temperatura ambiente, durante cinco minutos cada uno. Luego, se realizaron dos lavados con 200 µL del buffer Tris (hidroximetil aminometano)-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) a temperatura ambiente, por cinco minutos. La mezcla de reacción para la PCR se preparó con un volumen final de 12.5 µL, con 6.25 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2X (Promega® Madison, WI, EUA), 0.625 µL de cada primer (*GDF9*; exón 2: For-5'-GGAGAAAAGGGACAGAAGC-3' y Rev- 5'-ACGACAGGTACTTAGT-3' (21); 10 µM; IDT®, Illinois, EUA) y 5 µL de dihidrato de trehalosa al 10% (en agua libre de nucleasas y proteasas, Merck® KGaA 64271, Darmstadt, Alemania).

La amplificación del exón 2 del gen *GDF9* se realizó mediante la técnica de PCR. Los tubos con el fragmento de la minitarjeta procesada y la mezcla de reacción se colocaron en un termociclador (GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystems; California, EUA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: *GDF9*, exón 2 desnaturalización

inicial, 93°C, tres minutos, más 35 ciclos (desnaturalización, 93°C, 40 s; alineamiento, 56°C, 40 s y extensión, 72°C, 40 s) y extensión final, 72°C, cinco minutos. De los productos de PCR o amplicones, se tomaron 3 uL y se mezclaron con 3 uL de amortiguador de carga Loading Dye 6x y se utilizó un marcador molecular Φ X174 DNA-Hae III (New England BioLabs, MA, EUA). Posteriormente, esta mezcla de amplicones y colorante se migró en gel de agarosa al 1% a 90 V durante 40 min, para visualizar el tamaño del fragmento (1034 pb) del exón 2 en el gen *GDF9*. La visualización de los fragmentos se realizó con un transiluminador con luz UV (MiniBIS Pro, DNR Bio-Imaging Systems, Neve Yamin, Israel), con el uso del software GelCapture.

Tratamientos. Las ovejas se distribuyeron aleatoriamente en cada uno de los cuatro tratamientos experimentales: T1(n=15) ovejas sin presencia de gen y sin la aplicación de eCG (Testigo, 0/0), T2 (n=16) ovejas sin la presencia de gen y con la aplicación de eCG (0/1); T3 (n=16) ovejas con presencia de gen y sin la aplicación de eCG (1/0) y T4 (n=16) ovejas con presencia del gen y con aplicación de eCG (1/1; Figura 1).

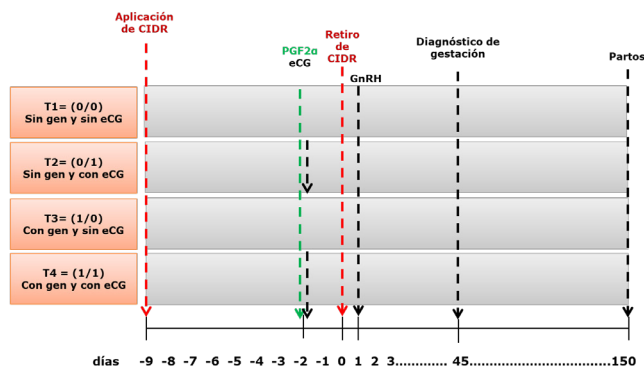


Figura 1. Agrupamiento de ovejas por tratamiento con cronología del protocolo de sincronización del estro, con el uso de hormonas exógenas: progesterona (CIDR), prostaglandina F2 α (PGF2 α), gonadotropina coriónica equina (eCG), hormona liberadora de gonadotropina (GnRH).

Sincronización de estros. La sincronización del estro de las ovejas se inició con la aplicación del dispositivo intravaginal CIDR a base de progesterona al día -9 (0.35 g CIDR[®], Pfizer), previo al retiro del dispositivo. El día -2, se administró 1 mL de PGF2 α análoga (250 mcg de Celosil, Schering-Plough Veterinaria) y 1.75

mL de gonadotropina coriónica equina (350 UI eCG, novormon 5000, Zoetis, 5000 UI de eCG liofilizada en 25 mL) vía intramuscular, de acuerdo con el tratamiento asignado (Figura 1). El retiro del CIDR se consideró día 0. Todas las ovejas recibieron aplicación de 1 mL de Gonadotropina (50 μ g, GnRH, Sanfer), 24 h después del retiro del CIDR.

Detección de estros e inseminación artificial. La detección del estro se realizó con ayuda de cuatro machos marcadores con delantal, introducidos cada seis horas (en sesiones de 30 min) desde el retiro del dispositivo CIDR y se continuó durante un periodo de 72 h, con el registro de las horas transcurridas desde el retiro del CIDR hasta el inicio del estro. La inseminación artificial (IA) se realizó vía intrauterina (en las ovejas que presentaron estro) mediante laparoscopia, con semen fresco y dosis de 100 millones de espermatozoides. Todas las inseminaciones se realizaron a las 12 h después de que la hembra presentó estro al aceptar la monta sin coito del macho marcador.

Diagnóstico de gestación. El diagnóstico de gestación se realizó a los 45 días post-inseminación, mediante ultrasonido de tiempo real de 6–8 Mhz con transductor rectal (Universal Medical Systems, Inc. UMS 900). El número de ovejas gestantes se registró con relación a las ovejas inseminadas y se monitorearon hasta el parto para registrar el número de ovejas que llegaron a la parición.

Prolificidad y fecundidad. Para determinar estas dos variables, se atendieron los partos registrando el número de corderos nacidos por oveja parida (prolificidad) y por el total de ovejas por tratamiento (fecundidad). Y se obtuvieron proporciones como medida de las variables.

Análisis estadístico. Las ovejas se asignaron a los corrales usando el arreglo factorial 2x2 bajo un diseño experimental completamente al azar, donde los factores y niveles fueron la ausencia o presencia del exón 2 del gen *GDF9* y la aplicación o no de la hormona eCG en el protocolo de sincronización del estro, respectivamente. Los análisis estadísticos se realizaron usando el software R, versión 4.1.3 (29). Para analizar la variable horas al inicio del estro, se utilizó la función *aov* del paquete *agricolae* (30), usando el modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

para $i=2; j=2; k=16$. Donde Y_{ijk} representa el valor de la variable horas al inicio del estro, μ es la media general, A_i es el efecto del nivel de i (presencia o ausencia del gen), B_j es el efecto del nivel de j (aplicación o no de eCG), AB_{ij} corresponde al efecto de la interacción de los dos factores y ϵ_{ijk} es el error aleatorio que obedece $\epsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$.

Con este modelo se determinó la significancia de cada factor y su interacción en las horas al inicio del estro. Posteriormente, con la función *TukeyHSD* del paquete *stats* (29) se realizó la comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$). Para horas al inicio del estro, se construyó una gráfica de curvas de supervivencia mediante las funciones *survfit* (*survival*) (31) y *ggsurvplot* (*survminer*) (32), que muestra la probabilidad del tiempo en horas para el inicio del estro una vez retirado el CIDR.

Mediante regresión logística y una prueba de χ^2 , se analizaron las variables respuesta, presencia de estro, retorno al estro, porcentaje de gestación (%) y porcentaje de parición (%) con un modelo binomial; mientras que, fecundidad y prolificidad se analizaron con el modelo gaussiano, usando las funciones *glm* y *anova* de *stats* (29), para determinar la significancia estadística de las variables explicativas presencia o ausencia del gen *GDF9* y aplicación o no de eCG en las variables respuesta.

Las variables presencia y retorno al estro, porcentaje de gestación y porcentaje de parición, se analizaron mediante pruebas de proporción usando la función *prop.test* del paquete *stats* (29), para determinar la significancia ($p < 0.05$) de la diferencia entre los tratamientos. Para fecundidad y prolificidad se realizó comparación de medias por el método de Bootstrapping (29).

RESULTADOS

Efecto del gen *GDF9* y eCG. En la Tabla 1 se muestra la evidencia estadística del efecto significativo de la aplicación de eCG en el comportamiento reproductivo de ovejas de la raza Katahdin, no así para la presencia del exón 2 del gen *GDF9*. Sin embargo, no existió interacción entre los factores *GDF9* x eCG ($p > 0.05$). Para retorno al estro no hubo efecto significativo para ninguno de los factores.

Tabla 1. Valores de p para las pruebas estadísticas ANOVA¹ factorial 2x2 completamente al azar y regresión logística (modelos binomial² y gaussiano³) de los efectos del gen *GDF9*, la hormona eCG y la interacción *GDF9* x eCG en las variables reproductivas de ovejas de la raza Katahdin.

Parámetro	Factor		
	<i>GDF9</i>	eCG	<i>GDF9</i> x eCG
Horas al inicio del estro ¹	0.62	2.63x10 ^{-9*}	0.45
Presencia de estro ²	0.90	3.78x10 ^{-12*}	0.97
Retorno al estro ²	0.36	0.31	0.14
Fecundidad ³	0.19	2.12x10 ^{-10*}	0.23
Prolificidad ³	0.61	SC	SC
% de gestación ²	0.72	5.77x10 ^{-9*}	1.00
% de parición ²	0.37	3.31x10 ^{-10*}	0.99

Valores de p^* con efecto significativo ($p < 0.05$). SC=valores de p sin calcular, debido a falta de observaciones en uno de los niveles del factor.

Variables asociadas con estro. Los tratamientos en los que se aplicó eCG presentan mejor comportamiento reproductivo asociado con el estro. En la Tabla 2, se observa que para presencia del estro T2 y T4 (ambos con aplicación de eCG) son los mejores ($p < 0.05$), los cuales superan por más de 12 veces a T1 y T3, lo cual muestra una evidencia de la superioridad de estos. Para las horas al inicio del estro, T2 y T4 muestran superioridad frente a T1 y T3. A pesar que T1 mostró evidencia de menor tiempo para esta variable, el error estándar sugiere que este valor se midió a partir de una sola observación, por lo que el resultado no se considera definitivo. Algo similar ocurre con retorno al estro, donde T1 mostró valores ideales; sin embargo, la media es el resultado de una sola observación, por lo que, de igual forma, no es un resultado conclusivo. Por último, para retorno al estro, T2 (con eCG) presenta el menor porcentaje (sin considerar T1), indicando la superioridad de este frente a los otros tratamientos para esta variable.

De acuerdo con la Figura 2, no existieron diferencias entre las probabilidades de las horas al inicio del estro entre los cuatro tratamientos ($p > 0.05$), debido a la gran variación de los valores de riesgo entre tratamientos. Sin embargo, los tratamientos con eCG muestran menor cantidad de horas al inicio del estro; es decir, para los tratamientos con eCG (T2; 0/1 y T4; 1/1) es más probable que el estro

ocurra antes de las 18 h después de retirado el CIDR; mientras que, para los tratamientos sin eCG (T1; 0/0 y T3; 1/0) es más probable que el estro ocurra después de las 15 h (Figura 2).

Tabla 2. Porcentajes y medias (± error estándar) por tratamiento de las variables reproductivas asociados con el estro de ovejas de la raza Katahdin.

Tratamientos GDF9/eCG	Presencia de estro a las 72h (%)	Horas al inicio del estro (h)	Retorno al estro (%)
T1 0/0	6.67 ±6.67 ^b	18.00 ±0.00 ^a	0.00 ±0.00 ^a
T2 0/1	87.50 ±8.54 ^a	24.86 ±3.13 ^b	14.29 ±9.71 ^b
T3 1/0	6.25 ±6.25 ^b	36.00 ±0.00 ^c	100.00 ±0.00 ^c
T4 1/1	87.50 ±8.54 ^a	21.43 ±2.65 ^b	21.43 ±11.38 ^b

T1= sin gen y sin eCG (Testigo, 0/0); T2= sin gen y con eCG (0/1); T3= con gen y sin eCG (1/0) y T4= con gen y con eCG (1/1). Valores con diferente superíndice (^{a, b, c}) por columna indican diferencia significativa (p<0.05).

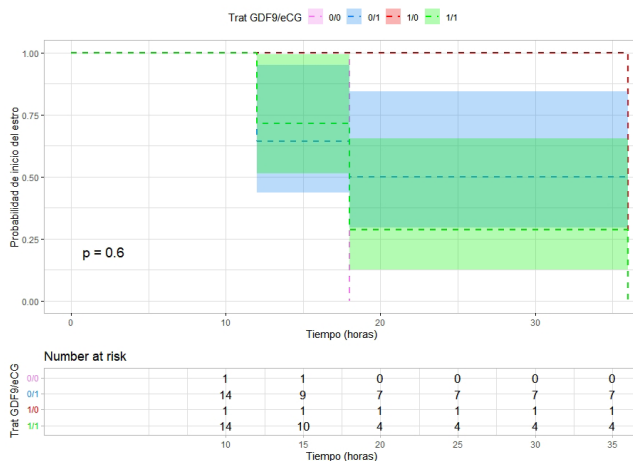


Figura 2. Curva de probabilidad con valor de riesgo para horas al inicio del estro por tratamiento (Trat) en ovejas de la raza Katahdin, construida a partir de los estimadores de supervivencia de Kaplan-Meier.

Porcentajes de gestación y parición. Existió evidencia de la superioridad del T2 frente a los demás tratamientos para variables de fertilidad (Tabla 3). Para T1 y T3 no hubo ovejas gestantes ni paridas. Mientras tanto, T2 fue significativamente mayor que T4 para las variables porcentaje de gestación y de parición (p<0.05).

Tabla 3. Porcentajes (± error estándar) de gestación y parición por tratamiento en ovejas de la raza Katahdin.

Tratamientos GDF9/eCG	Gestación (%)	Parición (%)
T1 0/0	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c
T2 0/1	62.50 ± 12.50 ^a	75.00 ± 11.18 ^a
T3 1/0	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c
T4 1/1	56.25 ± 12.81 ^b	56.25 ± 12.81 ^b

T1= sin gen y sin eCG (Testigo, 0/0); T2= sin gen y con eCG (0/1); T3= con gen y sin eCG (1/0) y T4= con gen y con eCG (1/1). Valores dentro de columnas con diferentes superíndices (^{a, b, c}) indican diferencia significativa (p<0.05).

Índices de prolificidad y fecundidad. Al igual que en secciones anteriores, T2 y T4 (con eCG) sobresalen por sus valores altos (Tabla 4). Existió evidencia de la superioridad de T2 y T4 frente a T1 y T3 para fecundidad y prolificidad (p<0.05). Aunque T2 es mayor que T4 en un 0.38 y 0.14 para fecundidad y prolificidad, respectivamente; no hay diferencias significativas entre los tratamientos (p>0.05).

Tabla 4. Índices (± error estándar) de fecundidad y prolificidad por tratamiento en ovejas de la raza Katahdin.

Tratamiento GDF9/eCG	Fecundidad	Prolificidad
T1 0/0	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
T2 0/1	1.19 ± 0.21 ^a	1.58 ± 0.13 ^a
T3 1/0	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
T4 1/1	0.81 ± 0.23 ^a	1.44 ± 0.18 ^a

T1= sin gen y sin eCG (Testigo, 0/0); T2= sin gen y con eCG (0/1); T3= con gen y sin eCG (1/0) y T4= con gen y con eCG (1/1). Valores dentro de columnas con diferentes superíndices (^{a, b}) indican diferencia significativa (p<0.05).

DISCUSIÓN

A pesar que en estudios recientes se ha comprobado un efecto en el comportamiento reproductivo de algunas variantes del exón 2 del gen *GDF9* en ovejas Luzhong, Rambouillet (*FecG^B*) y africanas Rahmani (*FecG^H*) (33) y un efecto significativo en tasa de ovulación y prolificidad en ovejas de la raza Pelibuey portadoras de la variante mutada Embrapa (GG) con respecto al grupo silvestre (AA) y grupo sin gen (sG) (22) y en tasa ovulatoria con el grupo mutado o Embrapa (GG) en ovejas de la raza Santa Inés (21), para el presente estudio los efectos del exón 2 del gen *GDF9* en ovejas de

la raza Katahdin no fueron significativos. Estos resultados muestran una similitud al estudio reportado en ovejas de la raza Santa Inés (34), donde utilizaron eCG en ovejas con presencia del alelo *FecGE* en el exón 2 del gen *GDF9*, donde los autores reportaron que no mejoró la producción de embriones en protocolos para superovulación.

La nula significancia del factor gen *GDF9* puede deberse a que existen regiones intragénicas independientes al exón 2, que impactan negativamente la fertilidad y que no fueron caracterizadas en este estudio. Al estudiar el gen *GDF9* completo en ovejas Cambridge y Belclare, se reportaron ovejas estériles para los genotipos homocigóticos asociados con la esterilidad en la región polimórfica G8 (12). Las mutaciones presentes en el exón 2 del gen *GDF9* que impactan positivamente en el comportamiento reproductivo en algunas razas de ovejas, tales como alta fertilidad (12), Thoka islandesa (17), Vecaria (18), Finnsheep (19,20) y Embrapa o Santa Inés (21), no se han reportado para ovejas de la raza Katahdin. El análisis exclusivo para el exón 2, sin la determinación de las variantes genéticas antes indicadas, pudo causar un sesgo en las estimaciones, dado que tampoco se conoce la secuencia ni los polimorfismos asociados negativamente con variables reproductivas para la raza como el polimorfismo G8 (12). Además, en este estudio no se caracterizó la población de ovejas para el exón 1, que también se reporta, tiene efectos favorables en la prolificidad (11).

Existe la posibilidad de la interacción intergénica o epistasis como una de las causas de la ausencia de efectos significativos del exón 2 del *GDF9*, en variables reproductivas de ovejas raza Katahdin. En estudios *in vitro* en células del cúmulus existe evidencia de la asociación del gen *GDF9* con los genes *BMP15* y *BMP1B* en la regulación de la prolificidad en rumiantes (35,36). Estudios reportaron en el tejido ovárico de ovejas Small Tail Han (con partos de dos o más corderos) niveles altos de *GDF9* y *BMP1B*; mientras que, los niveles de *BMP15* en estas condiciones fueron menores ($p < 0.01$). Por el contrario, la expresión de *BMP15* fue mayor ($p < 0.01$) en comparación con *GDF9* y *BMP1B* en ovejas Sunite con partos de un solo cordero (14). El mejoramiento genético del comportamiento reproductivo en ovejas es complejo; en este estudio en particular, puede depender de los polimorfismos o variantes genéticas presentes en la región intragénica de

todo el gen *GDF9* y no solo del exón 2; además, de la interacción intergénica y de las mutaciones diferenciadas entre razas.

Los tratamientos que incluyeron la aplicación de eCG tuvieron resultados mayores en las variables reproductivas, en comparación con los tratamientos que solo incluían el gen *GDF9* y el tratamiento testigo. Al aplicar eCG en tratamientos cortos y largos de hasta 14 días, se ha observado que acorta la manifestación del estro con una buena calidad de ovulación en comparación con tratamientos que solo usan CIDR (progesterona) por más de 5 días (37). Así también se obtienen mejores resultados en otras variables reproductivas, principalmente en aquellas relacionadas con el estímulo de incremento folicular en programas de superovulación y transferencia de embriones (38), y el desarrollo de ovocitos y folículos *in vitro* (7). En general, una mayor dosis de eCG corresponde una mejor respuesta en las variables: horas para presencia y respuesta al estro, aumento en la tasa de gestación y prolificidad (6).

La hormona eCG es una alternativa viable al uso de la hormona foliculoestimulante (FSH), ya que tiene una vida media prolongada; además, incrementa la ovulación múltiple con un rendimiento mayor del crecimiento folicular, participa en la formación del antro, mejora la actividad esteroidogénica y puede provocar mejor incidencia de ovocitos meióticos competentes (7). Por otro lado, en ovejas de la raza Katahdin en México, se han reportado posibles desventajas en la combinación de FSH en dosis decrecientes con eCG, lo cual genera un mayor número de ovocitos que se convierten en embriones degenerados en época no reproductiva (39). En la presente investigación, una dosis de 350 UI de eCG mejoró la prolificidad de las ovejas de la raza Katahdin. La prolificidad en el T2 (1.58 ± 0.13) y el T4 (1.44 ± 0.18) fue similar al rango de prolificidad reportada en ovejas de pelo de 1.2 a 2.3, a las que se les aplicó 250 y 400 UI de eCG, respectivamente (6). Por lo tanto, para aumentar el número de crías en el rebaño, se recomienda una aplicación mínima de 350 UI de eCG en protocolos de sincronización de estros en ovejas de la raza Katahdin en época de transición.

Por otro lado, los tratamientos a los que no se les administró eCG (T1 y T3) mostraron rendimientos reproductivos nulos. No se

esperaba una respuesta tan baja para los grupos sin aplicación de eCG, ya que en otros estudios aún sin tratamiento hormonal, el comportamiento reproductivo ha sido mayor (40). Esta respuesta negativa pudo deberse a la calidad del suplemento o *flushing* y, aunado probablemente a la época de transición. En un estudio con ovejas de la raza Katahdin (41) se ofreció harina de almendra de palma como suplemento en época de anestro; los autores obtuvieron mejores resultados que en la presente investigación con una prolificidad de 1.0 ± 0.2 contra 0.0 ± 0.0 del presente estudio. Lo anterior quizá pudo ser efecto por la diferencia calórica entre suplementos ofrecidos, dado que en este estudio se ofreció un producto comercial con 2.4 Mcal kg^{-1} , en contraste con la harina de almendra de palma con 3.3 Mcal kg^{-1} .

Posiblemente la deficiencia calórica del producto comercial y del forraje, originaron niveles bajos de nutrientes durante la fase folicular. Se reporta que el aumento de nutrientes en sangre por suplementación a corto plazo estimula la foliculogénesis y la ovulación al aumentar los niveles de FSH y disminuir los de estradiol; este efecto está asociado con el sistema metabólico intramolecular de insulina, glucosa, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y leptina a nivel ovárico (42).

En ovejas Sardas lecheras en fase terminal de anestro, suplementadas durante cuatro días con una mezcla de glicerol y propilenglicol (sustancias que generan aumento de glucosa en sangre), no existieron diferencias para prolificidad y fecundidad en comparación con un grupo de ovejas de la misma raza, a las cuales se les aplicó 200 UI de eCG (43). Por lo tanto, en el presente estudio, posiblemente no se alcanzaron los umbrales de nutrientes en sangre, lo que limitó el desempeño reproductivo en aquellas ovejas de la raza Katahdin de los tratamientos T1 y T3. Un adecuado nivel calórico durante el *flushing* en época no reproductiva o de transición, puede ser detonante de la ruptura del anestro poco profundo en las ovejas de la raza Katahdin, para superar los efectos hormonales de los días largos, tales como bajas concentraciones y frecuencias hormonales de LH y FSH a nivel sistémico como folicular, y de esta manera manifestar estro derivado de la maduración folicular, dando inicio al ciclo estral (44,45). La oveja de la raza Kathadin tiene parámetros reproductivos similares a la oveja

de la raza Pelibuey (10). Ambas razas en México poseen anestro poco marcado de enero a junio (41,46) con mejor actividad estral en verano y otoño (47). A pesar del anestro poco marcado en la raza Katahdin, las ovejas (T1 y T3) del presente estudio en el periodo de transición presentaron parámetros reproductivos deficientes, atribuible posiblemente al bajo nivel de energía del suplemento, comparado con lo encontrado en otros estudios con condiciones similares (41). Se ha reportado que la nutrición es un factor no genético que afecta de manera importante la prolificidad en ovejas desde su nacimiento hasta la época reproductiva (48,49). Por lo antes mencionado, es importante identificar los factores genéticos del rebaño para diseñar estrategias que mejoren el desempeño reproductivo mediante su interacción con factores ambientales y lograr el mejoramiento genético de las ovejas (50,51).

El presente estudio muestra evidencia de la nula interacción del efecto del exón 2 del gen *GDF9* y la eCG para mejorar el rendimiento reproductivo de ovejas de la raza Katahdin para las variables: sincronización y retorno al estro, % de gestación y parición, prolificidad y fecundidad. Estos resultados no son definitivos, ya que el efecto aditivo, dominante y epistático de los genes asociados con *GDF9* en la raza ha sido poco estudiado. Para el gen *GDF9* en la raza Katahdin, se necesita una amplia investigación de las características del gen (genotipos y polimorfismos) y la caracterización molecular de la interacción con otros genes. No obstante, independientemente del nulo efecto del gen *GDF9* en la respuesta de variables reproductivas, los resultados con la aplicación de eCG hacen recomendable su aplicación en protocolos de sincronización de estros para ovejas de la raza Katahdin en la época de transición. Los resultados de este estudio se consideran preliminares y en algunos parámetros reproductivos no conclusivos, dado el tamaño de muestra en algunas de las mediciones. A pesar de lo anterior, este estudio sirve como antecedente para futuras investigaciones; en particular, estudios de la asociación del genoma completo para encontrar nuevos genes candidatos asociados con reproducción de ovejas, dado que el exón 2 del gen *GDF9* en esta investigación no tuvo influencia en variables reproductivas en ovejas de raza Katahdin.

Conflicto de interés

Los autores de este estudio declaramos que no existe conflicto de intereses con la publicación del presente manuscrito.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Campus SLP, Colegio de Postgraduados, por el apoyo financiero para realizar esta investigación, a las Líneas de Generación y/o Aplicación del Conocimiento: Manejo Sustentable de Recursos Naturales (Campus SLP) e Innovación Tecnológica y Seguridad Alimentaria en Ganadería (Campus Montecillo) y a los M.V.Z. Iliá Hernández Torres y Dante Josafet Hernández Rubio, por su apoyo logístico y de campo en el estudio.

REFERENCIAS

- Bobadilla-Soto EE, Salas-Razo G, Padillas-Flores JP, Perea-Peña M. Unit displacement of sheep production in Mexico by effect of imports. *Int J Dev Res.* 2015; 5(2):3607-3612. <http://www.journalijdr.com/unit-displacement-ofsheep-production-mexico-effect-imports>
- Hernández-Marín JA, Valencia-Posadas M, Ruíz-Nieto JE, Mireles-Arriaga AI, Cortez-Romero C, Gallegos-Sánchez J. Contribución de la ovinocultura al sector pecuario en México. *Agro productividad.* 2017; 10(3):87-93 <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/975/833>
- Lucio R, Sesento L, Bedolla JLC, Cruz AR. Parámetros genéticos para pie de cría en ovinos de la raza katahdin Genetic parameters for breeding stock in sheep of katahdin race. *Rev Csc Nat & Agrop.* 2018; 5(16):1-5. [https://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/CienciasNaturalesyAgropecuarias/vol5num16/Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias V5 N16 1.pdf](https://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/CienciasNaturalesyAgropecuarias/vol5num16/Revista%20de%20CienciasNaturalesyAgropecuariasV5N161.pdf)
- González-Reyna A, Martínez-González JC, Hernández-Meléndez J, Lucero-Magaña FA, Castillo-Rodríguez SP, Vásquez-Armijo, et al. Reproducción de ovinos de pelo en regiones tropicales de México. *Ciencia Agropecuaria* 2020; 31:182-199. <http://www.revistacienciaagropecuaria.ac.pa/index.php/ciencia-agropecuaria/article/view/309/248>
- Hameed N, Khan MIUR, Zubair M, Andrabi SMH. Approaches of estrous synchronization in sheep: developments during the last two decades - a review. *Trop Anim Health Prod.* 2021; 53(5):1-10. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02932-8>
- López J, Salinas D, Baracaldo-Martínez A, Gómez C, Herrera-Ibatá D, Atuesta-Bustos JE. Efecto de la dosis de gonadotropina coriónica equina (eCG) asociada a protocolos cortos de sincronización de celo sobre el desempeño reproductivo de ovejas de pelo. *Rev Investig Vet Perú.* 2021; 32(1). <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i1.17775>
- Di Bernardino C, Peserico A, Capacchietti G, Crociati M, Monaci M, Tosi U, et al. Equine Chorionic Gonadotropin as an Effective FSH Replacement for In Vitro Ovine Follicle and Oocyte Development. *Int J Mol Scs.* 2021; 22(22):12422. <https://doi.org/10.3390/ijms222212422>
- Hashem NM, El-Azrak KM, Nour El-Din AN, Taha TA, Salem MH. Effect of GnRH treatment on ovarian activity and reproductive performance of low-prolific Rahmani ewes. *Theriogenology.* 2015 Jan 15;83(2):192-198. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.016>

9. Gebreselassie G, Berihulay H, Jiang L, Ma Y. Review on Genomic Regions and Candidate Genes Associated with Economically Important Production and Reproduction Traits in Sheep (*Ovis aries*). *Animals*. 2019; 10(1):33. <https://doi.org/10.3390/ani10010033>
10. Chay-Canul AJ, García-Herrera RA, Magaña-Monforte JG, Macías-Cruz U, Luna-Palomera C. Productividad de ovejas Pelibuey y Katahdin en el trópico húmedo. *Recursos Agropecuarios*. 2019; 6(16):159-65. <https://doi.org/10.19136/era.a6n16.1872>
11. Ibrahim AHM. Genetic variants of the BMP2 and GDF9 genes and their associations with reproductive performance traits in Barki ewes. *Small Rumin Res*. 2021; 195:106302. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106302>
12. Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, et al. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod*. 2004; 70(1):900–909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023093>
13. De Castro FC, Cruz MHC, Leal CLV. Role of Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and their importance in mammalian female fertility - A review. *Asian-Australasian J Anim Sci*. 2016; 29(8):1065–1074. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0797>
14. Tang J, Hu W, Di R, Wang X, Zhang X, Zhang J, et al. Expression analysis of *BMPR1B*, *BMP15*, and *GDF9* in prolific and non-prolific sheep breeds during the follicular phase. *Czech J Anim Sci*. 2019; 64(11):439–447. <https://doi.org/10.17221/101/2018-cjas>
15. Trauss JF, Williams CJ. Ovarian Life Cycle. In: Yen and Jaffe's 9^a edition. *Reproductive Endocrinology*. 2019; <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00008-1>
16. Juengel JL, Davis GH, McNatty KP. Using sheep lines with mutations in single genes to better understand ovarian function. *Reproduction* 2013; 146(4):111–123. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0509>
17. Nicol L, Bishop SC, Pong-Wong R, Bendixen C, Holm LE, Rhind SM, McNeilly AS. Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte-specific *GDF9* gene results in sterility in Thoka sheep. *Reproduction*. 2009; 138(6):921–933. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0193>
18. Souza CJH, McNeilly AS, Benavides MV, Melo EO, Moraes JCF. Mutation in the protease cleavage site of *GDF9* increases ovulation rate and litter size in heterozygous ewes and causes infertility in homozygous ewes. *Anim Genet*. 2014; 45(5):732–739. <https://doi.org/10.1111/age.12190>
19. Våge DI, Husdal M, Kent MP, Klemetsdal G, Boman IA. A missense mutation in growth differentiation factor 9 (*GDF9*) is strongly associated with litter size in sheep. *BMC Genet*. 2013; 14(1):1. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-1>
20. Mullen MP, Hanrahan JP. Direct evidence on the contribution of a missense mutation in *GDF9* to variation in ovulation rate of Finnsheep. *PLoS One*. 2014; 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095251>
21. Silva BDM, Castro E A, Souza CJH, Paiva SR, Sartori R, Franco M. et al. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (*GDF9*) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep: New polymorphism in *GDF9* and prolificacy. *Animal Genetics*. 2011; 42(1):89–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02078.x>
22. Muñoz-García C, Vaquera-Huerta H, Gallegos-Sánchez J, Becerril-Pérez CM, Tarango-Arámbula LA, Bravo-Vinaja Á. et al. Influence of *FecGE* mutation on the reproductive variables of Pelibuey ewes in the anestrus period. *Trop Anim Health Prod*. 2021; 53(2):328. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02755-7>

23. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen: para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana - 5^{ta} Edición. Instituto de Geografía: UNAM México, Méx. 2004. <http://www.publicaciones.igg.unam.mx/index.php/ig/catalog/view/83/82/251-1>
24. SMN (Servicio Meteorológico Nacional). Información Estadística Climatológica de México por estado. 2022. <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/informacion-climatologica/informacion-estadistica-climatologica>
25. Phythian CJ, Michalopoulou E, Duncan JS. Assessing the Validity of Animal-Based Indicators of Sheep Health and Welfare: Do Observers Agree? *Agriculture* 2019; 9(5):88. <https://doi.org/10.3390/agriculture9050088>
26. NRC: National Research Council. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. The National Academies Press. Washington, D.C. 2007. <https://doi.org/10.17226/11654>.
27. 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. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca, y Alimentación (SAGARPA): México; 2001. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf
28. 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. http://www.colpos.mx/wb_pdf/norma_interna/reglamento_usoycuidadoanimales_050819.pdf
29. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria; 2021. <https://www.R-project.org/>.
30. de Mendiburu F. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.3-5. 2021. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
31. Therneau TM, Grambsch PM. Modeling Survival Data: Extending the Cox Model. Springer, New York; 2000. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3294-8_3
32. Kassambara A, Kosinski, M, Biecek, P. survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'. R package version 0.4.9. 2021. <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>
33. Wang F, Chu M, Pan L, Wang X, He X, Zhang R, et al. Polymorphism detection of *GDF9* gene and its association with litter size in Luzhong mutton sheep (*Ovis aries*). *Animals* (Basel). 2021; 11(2):571. <https://doi.org/10.3390/ani11020571>
34. Pinto PHN, Balaro MFA, Souza-Fabjan JMG, Ribeiro L dos S, Bragança G M, et al. Anti-Müllerian hormone and antral follicle count are more effective for selecting ewes with good potential for in vivo embryo production than the presence of FecG^F mutation or eCG pre-selection tests. *Theriogenology*. 2018; 113:146–152. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.02.018>
35. Chen H, Liu C, Jiang H, Gao Y, Xu M, Wang J, et al. Regulatory Role of miRNA-375 in expression of BMP15/GDF9 receptors and its effect on proliferation and apoptosis of bovine cumulus cells. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 41:439-450. <https://doi.org/10.1159/000456597>
36. Liu C, Yuan B, Chen H, Xu M, Sun X, Xu J, et al. Effects of MiR-375-BMP15/GDF9 on the Smad1/5/8 and Smad2/3 signaling pathways. *Cell Physiol Biochem*. 2018; 46:213-225. <https://doi.org/10.1159/000488424>
37. Martínez-Ros P, Astiz S, García-Rosello E, Ríos-Abellán A, & González-Bulnes A. Effects of short-term intravaginal progestagens on the onset and features of estrus, preovulatory LH surge and ovulation in sheep. *Anim reprod sci*. 2018; 197:317-323. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.046>

38. Bruno-Galarraga M, Cueto M, Gibbons A, Pereyra-Bonnet F, Subiabre M, González-Bulnes A, Preselection of high and low ovulatory responders in sheep multiple ovulation and embryo transfer programs. *Theriogenology*. 2015; 84(5):784-790. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.011>
39. Luna-Palomera C, Macías-Cruz U, Sánchez-Dávila F. Respuesta superovulatoria y calidad embrionaria en ovejas Katahdin tratadas con FSH o FSH más eCG fuera de la época reproductiva. *Trop Animal Health Prod*. 2019; 51:1289-1288. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01801-9>
40. Habibizad J, Riasi A, Kohram H, Rahmani HR. Effect of long-term supplementation of high energy or high energy-protein diets on ovarian follicles and blood metabolites and hormones in ewes. *Small Ruminant Res*. 2015; 132:37-43. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.10.004>
41. Luna-Palomera C, Berumen-Alatorre AC, Aguilar-Cabrales JA, Cansino GR. Fertilidad en ovejas de pelo complementadas con harina de almendra de palma africana. *Livest Res Rural Dev*. 2010; 22:1-7. <http://www.lrrd.org/lrrd22/10/luna22178.htm>
42. Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Downing JA, et al. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev*. 2006; 46(4):339-354. <https://doi.org/10.1051/rnd:2006016>
43. Sotgiu FD, Porcu C, Pasciu V, Dattena M, Gallus M, Argiolas G, et al. Towards a sustainable reproduction management of dairy sheep: Glycerol-Based formulations as alternative to eCG in milked ewes mated at the end of anoestrus period. *Animals*. 2021; 11(4):922. <https://doi.org/10.3390/ani11040922>
44. O'Callaghan D, Yaakub H, Hyttel P, Spicer L J, & Boland M P. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J Reprod Fertil*. 2000; 118(2):303-313. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10864794/>
45. Ahmad Pampori Z, Ahmad Sheikh A, Arif O, Hasin D, Ahmad Bhat, I. Physiology of reproductive seasonality in sheep—an update. *Biol. Rhythm Res*. 2020; 51(4):586-598. <https://doi.org/10.1080/09291016.2018.1548112>
46. Gastélum-Delgado MA, Avendaño-Reyes L, Álvarez-Valenzuela FD, Correa-Calderón A, Meza-Herrera CA, Mellado M, et al. Comportamiento de estro circanual en ovejas Pelibuey bajo condiciones áridas del Noroeste de México. *Rev Mex Cienc Pec*. 2015; 6:109-118. <https://www.redalyc.org/pdf/2656/265633002002.pdf>
47. Macías-Cruz U, Sánchez-Estrada TJ, Gastelum-Delgado MA, Avendaño-Reyes L, Correa-Calderón A, Álvarez-Valenzuela FD, et al. Actividad reproductiva estacional de ovejas Pelibuey bajo condiciones áridas de México. *Arch Med Vet*. 2015; 47(3):381-386. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2015000300016>
48. Hinojosa-Cuéllar JA, Oliva-Hernández J, Torres-Hernández G. "Productive performance of F-1 Pelibuey x Blackbelly lambs and crosses with Dorper and Katahdin in a production system in the humid tropic of Tabasco, Mexico. *Arch Med Vet*. 2013; 45(2):135-143. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2013000200004>
49. Plakkot B, Mohanan A, & Kanakkaparambil R. Prolificacy in small ruminants. *J Dairy Vet Anim*. 2020; 9(3):85-90. <http://dx.doi.org/10.15406/jdvar.2020.09.00284>
50. Ivanova T, Stoikova-Grigorova R, Bozhilova-Sakova M, Ignatova M, Dimitrova I, Koutev V. Phenotypic and genetic characteristics of fecundity in sheep. A review. *Bulg J Agric Sci*. 2021; 27(5):1002-1008.
51. Ajafar MH, Kadhim AH, & AL-Thuwaini TM. The Reproductive Traits of Sheep and Their Influencing Factors. *Rev Agric Sci*. 2022; 10:82-89. https://doi.org/10.7831/ras.10.0_82