



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**INFLUENCIA DE HORMONAS EXÓGENAS EN  
VARIABLES REPRODUCTIVAS, ESTRADIOL,  
PROGESTERONA E IDENTIFICACIÓN DE  
POLIMORFISMOS EN LOS GENES *TP-1* E *ISG15* DE  
OVEJAS**

MIGUEL PAUL CONDE HINOJOSA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2021

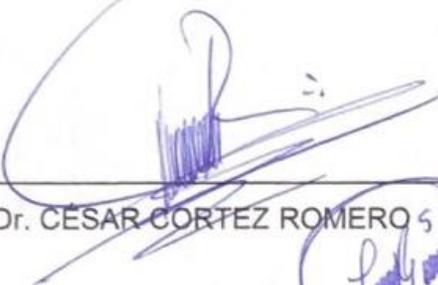
La presente tesis titulada: **Influencia de hormonas exógenas en variables reproductivas, estradiol, progesterona e identificación de polimorfismos en los genes TP-1 e ISG15 de ovejas**, realizada por el alumno: **Miguel Paul Conde Hinojosa**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA

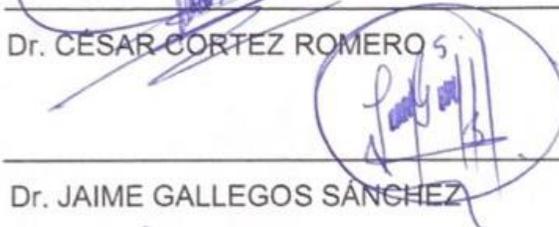
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



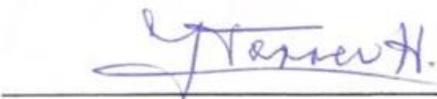
Dr. CÉSAR CORTEZ ROMERO

ASESOR



Dr. JAIME GALLEGOS SÁNCHEZ

ASESOR



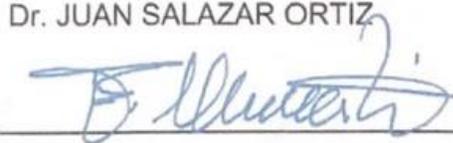
Dr. GLAFIRO TORRES HÉRNANDEZ

ASESOR



Dr. JUAN SALAZAR ORTIZ

ASESOR



Dr. FERNANDO CLEMENTE SÁNCHEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, junio de 2021

**INFLUENCIA DE HORMONAS EXÓGENAS EN VARIABLES REPRODUCTIVAS,  
ESTRADIOL, PROGESTERONA E IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN LOS  
GENES *TP-1* E *ISG15* DE OVEJAS**

**Miguel Paul Conde Hinojosa, D.C.**

**Colegio de Postgraduados**

**RESUMEN**

El uso de biotecnologías reproductivas puede incrementar los parámetros reproductivos. Se ha demostrado que los protocolos para sincronizar el estro en ovejas ayudan a incrementar la eficiencia reproductiva en ovejas, principalmente con el uso de hormonas exógenas, igualmente las herramientas de genética molecular son un recurso importante para mejorar la eficiencia reproductiva. El presente documento de tesis está compuesto por cuatro capítulos. El presente documento de tesis está compuesto por cuatro capítulos. Y los objetivos generales fueron: 1) evaluar la influencia de hormonas exógenas en variables reproductivas, en la medición de niveles séricos de estradiol y progesterona y 2) identificar polimorfismos en los genes *TP-1* e *ISG15* de ovejas, involucrados en el reconocimiento materno de la gestación. Se emplearon ovejas de pelo y Rideau Arcott que se ubicaron en diferentes protocolos de sincronización del estro y se les tomó muestras de sangre para progesterona, estradiol e identificar polimorfismos en los genes *TP-1* e *ISG15* (involucrados en el reconocimiento materno de la gestación). Se encontró que la adición de eCG en los protocolos de sincronización del estro influyó ( $p < 0.05$ ) en el inicio del estro de ovejas de pelo y Rideau Arcott. No se encontraron diferencias ( $p > 0.05$ ) en el retorno a estro de las ovejas de pelo y Rideau Arcott. Se

encontraron diferencias significativas en el índice de prolificidad y fecundidad de ovejas de pelo ( $p < 0.05$ ). En ovejas Rideau Arcott no se encontraron diferencias ( $p > 0.05$ ) en la prolificidad y fecundidad. Se encontraron diferencias ( $p < 0.05$ ) en los niveles plasmáticos de progesterona y estradiol en ovejas de pelo y Rideau Arcott. La suplementación de progesterona durante el periodo de reconocimiento materno de la gestación no mejoró la tasa de gestación en ovejas de pelo y Rideau Arcott ( $p > 0.05$ ). Y se identificaron tres polimorfismos de nucleótido simple en el gen *ISG15* de ovejas de la raza Rideau Arcott y cuatro polimorfismos de nucleótido simple en el gen *TP-1* de ovejas de pelo.

**Palabras clave:** ovejas, hormonas, estradiol, progesterona, polimorfismo.

**INFLUENCE OF EXOGENOUS HORMONES ON REPRODUCTIVE VARIABLES,  
ESTRADIOL, PROGESTERONE AND IDENTIFICATION OF POLYMORPHISMS IN  
THE TP-1 AND ISG15 GENES OF SHEEP**

**Miguel Paul Conde Hinojosa, D.C.  
Colegio de Postgraduados**

**ABSTRACT**

The use of reproductive biotechnologies can increase reproductive parameters. It has been shown that protocols to synchronize oestrus in sheep help to increase reproductive efficiency in sheep, mainly with the use of exogenous hormones, likewise molecular genetic tools are an important resource to improve reproductive efficiency. The general aims were: 1) to evaluate the influence of exogenous hormones on reproductive variables, in the measurement of serum levels of estradiol and progesterone and 2) to identify polymorphisms in the TP-1 and ISG15 genes of sheep, involved in the maternal recognition of gestation. Hair sheep and Rideau Arcott were used, which were located in different protocols of estrus synchronization and blood samples were taken for progesterone, estradiol and to identify polymorphisms in the TP-1 and ISG15 genes. It was found that the addition of eCG in the oestrus synchronization protocols influenced ( $p < 0.05$ ) the onset of oestrus in hair ewes and Rideau Arcott. No differences ( $p > 0.05$ ) were found in the return to estrus of hair ewes and Rideau Arcott. Significant differences were found in the prolificacy and fertility index of hair sheep ( $p < 0.05$ ). In Rideau Arcott ewes, no differences were found ( $p > 0.05$ ) in prolificacy and fecundity. Differences ( $p < 0.05$ ) were found in plasma levels of progesterone and estradiol in hair sheep and Rideau Arcott. Progesterone supplementation during the period of maternal recognition

of pregnancy did not improve the pregnancy rate in hair ewes and Rideau Arcott ( $p > 0.05$ ). And three single nucleotide polymorphisms were identified in the ISG15 gene of sheep of the Rideau Arcott breed and four single nucleotide polymorphisms in the TP-1 gene of hair sheep.

**Key words:** sheep, hormones, estradiol, progesterone, polymorphism.

## DEDICATORIA

A **tod@s** los que directa e indirectamente contribuyeron para la realización de esta tesis.

## AGRADECIMIENTOS

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

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

Al **Dr. César Cortez Romero** por la oportunidad que me otorgó y el tiempo dedicado a la revisión de éste trabajo, pero sobre todo por su amistad.

Al **Dr. Jaime Gallegos Sánchez** por su contribución en la realización del presente estudio.

Al **Dr. Glafiro Torres Hernández** por la revisión del presente estudio.

Al **Dr. Juan Salazar Ortiz** por las facilidades que me otorgó para la realización de ésta investigación.

Al **Dr. Fernando Clemente Sánchez** por las facilidades que me otorgó para la realización de ésta investigación.

Al **Dr. Humberto Vaquera Huerta** por su disposición y apoyo invaluable en el análisis estadístico de ésta investigación.

A mis sinodales, el **Dr. Arturo Pro Martínez** y la **Dra. Camelia Alejandra Herrera Corredor** por sus atinadas observaciones

Al **personal administrativo** del postgrado en ganadería.

**A todos los que me falta mencionar pero que con poco ó mucho, contribuyeron en la realización de este trabajo.**

## CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE CUADROS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>Literatura Citada.....</b>	<b>3</b>
<b>CAPITULO 1. GENES INVOLUCRADOS CON LA GESTACIÓN EN LA OVEJA:</b>	
<b>UN ENFOQUE BIBLIOMÉTRICO.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 RESUMEN .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
<b>1.5 RESULTADOS .....</b>	<b>13</b>
1.5.1 Crecimiento de la literatura .....	13
1.5.2 Tipología científica e idioma de publicación.....	13
1.5.3 Colaboración científica entre autores, países e instituciones .....	14
1.5.4 Instituciones con mayor aportación de publicaciones .....	15
1.5.5 Revistas de publicación y artículos más citados .....	16
1.5.6 Autores con mayor producción .....	19
1.5.7 Coautoría .....	20
1.5.8 Impacto de la investigación.....	21
1.5.9 Temáticas de la investigación y análisis de co-palabras.....	22

1.6 DISCUSIÓN .....	25
1.7 CONCLUSIONES .....	28
1.8 LITERATURA CITADA.....	29
<b>CAPITULO 2. IMPLICACIÓN DEL GEN INTERFERÓN TAU EN EL RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA GESTACIÓN EN LA OVEJA .....</b>	<b>34</b>
2.1 RESUMEN .....	34
2.2 ABSTRACT .....	35
2.3 INTRODUCCIÓN .....	36
2.4 Reconocimiento materno de la gestación e implantación .....	37
2.5 Función de la progesterona (P4) en el reconocimiento materno de la gestación .....	38
2.6 Interferones .....	39
2.6.1 Interferón tau (IFN $\tau$ ) y su participación en el reconocimiento de la gestación .....	39
2.7 Genes estimulados por el interferón (ISG) durante el reconocimiento materno de la gestación .....	42
2.7.1 El gen estimulado por el interferón 15 ( <i>ISG15</i> ) .....	43
2.8 Efecto del gen <i>ISG15</i> en el desarrollo embrionario en ovejas .....	43
2.9 CONCLUSIONES .....	44
2.10 LITERATURA CITADA.....	45
<b>CAPITULO 3. INFLUENCIA DE eCG Y PROGESTERONA EN VARIABLES REPRODUCTIVAS E IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN TP-1 EN OVEJAS DE PELO .....</b>	<b>50</b>

<b>3.1 RESUMEN .....</b>	<b>50</b>
<b>3.2 SUMMARY .....</b>	<b>51</b>
<b>3.3 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>52</b>
<b>3.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
3.4.1 Localización .....	53
3.4.2 Animales .....	53
3.4.3 Tratamientos.....	54
3.4.4 Presincronización y sincronización del estro .....	55
3.4.5 Detección de estros, monta natural y retornos a estro.....	56
3.4.6 Diagnóstico de gestación, prolificidad y fecundidad.....	56
3.4.7 Análisis de estradiol y progesterona .....	56
3.4.8 Análisis del gen TP-1 .....	57
3.4.9 Secuenciación y análisis de secuencias .....	59
3.4.10 Análisis estadístico .....	59
<b>3.5 RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
3.5.1 Manifestación e inicio al estro .....	61
3.5.2 Retorno a estro .....	62
3.5.3 Porcentaje de gestación y de parto.....	62
3.5.4 Índice de prolificidad y de fecundidad .....	62
3.5.5 Niveles de estradiol.....	63
3.5.6 Niveles de progesterona .....	64
3.5.7 Identificación del gen <i>TP-1</i> .....	65
3.5.8 Identificación de polimorfismos en el gen <i>TP-1</i> .....	66

3.5.9 Análisis de polimorfismos en el gen <i>TP-1</i> .....	68
<b>3.6 DISCUSIÓN .....</b>	<b>69</b>
<b>3.7 CONCLUSIONES .....</b>	<b>77</b>
<b>3.8 LITERATURA CITADA.....</b>	<b>78</b>
<b>CAPITULO 4. INFLUENCIA DE HORMONAS EXÓGENAS EN VARIABLES REPRODUCTIVAS E IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN ISG15 EN OVEJAS DE LA RAZA RIDEAU ARCOTT .....</b>	<b>83</b>
<b>4.1 RESUMEN .....</b>	<b>83</b>
<b>4.2 ABSTRACT .....</b>	<b>84</b>
<b>4.3 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>85</b>
<b>4.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>87</b>
4.4.1 Localización .....	87
4.4.2 Animales .....	87
4.4.3 Tratamientos .....	87
4.4.4 Presincronización y sincronización del estro .....	88
4.4.5 Detección de estros e inseminación artificial .....	89
4.4.6 Retorno a estro .....	89
4.4.7 Diagnóstico de gestación y porcentaje de parto .....	90
4.4.8 Prolificidad y fecundidad .....	90
4.4.9 Análisis de niveles plasmáticos de progesterona .....	90
4.4.10 Análisis molecular del gen ISG15 .....	91
4.4.11 Secuenciación y análisis de secuencias .....	93
4.4.12 Análisis estadístico .....	93

<b>4.5 RESULTADOS .....</b>	<b>94</b>
4.5.1 Manifestación e inicio del estro .....	94
4.5.2 Retorno a estro .....	95
4.5.3 Porcentaje de gestación y de parto.....	96
4.5.4 Prolificidad y fecundidad .....	96
4.5.5 Niveles de progesterona .....	96
4.5.6 Identificación del gen <i>ISG15</i> y sus polimorfismos.....	97
4.5.7 Análisis de polimorfismos en el gen <i>ISG15</i> .....	100
<b>4.6 DISCUSIÓN .....</b>	<b>101</b>
<b>4.7 CONCLUSIONES .....</b>	<b>107</b>
<b>4.8 LITERATURA CITADA.....</b>	<b>108</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>114</b>

## LISTA DE CUADROS

### CAPÍTULO 1

Cuadro 1 Indicadores bibliométricos utilizados. ....	12
Cuadro 2. Principales instituciones con mayor número de publicaciones. ....	15
Cuadro 3. Principales revistas con más documentos publicados en el tema de búsqueda y artículo más citado. ....	17
Cuadro 4. Autores con más publicaciones de temas relacionados con la búsqueda. .....	19
Cuadro 5. Primeras 20 palabras clave con mayor frecuencia y su índice de similaridad FA. ....	24

### CAPÍTULO 3

Cuadro 6. Resultados de las variables reproductivas evaluadas en ovejas de pelo sincronizadas en la época reproductiva. ....	63
Cuadro 7. Concentraciones plasmáticas de estradiol ( $\text{pg mL}^{-1}$ ) los días siete del protocolo de sincronización, al momento de la manifestación de estro y cinco días después de la monta por tratamiento (Media $\pm$ error estándar). .....	64
Cuadro 8. Concentraciones plasmáticas de progesterona ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) en los días 17, 19, 34 y 36 días post monta en ovejas de pelo sincronizadas en la época reproductiva (Media $\pm$ error estándar). ....	65
Cuadro 9. Prueba de Tajima (D) del gen TP-1. ....	69

## CAPÍTULO 4

Cuadro 10. Tiempo de inicio al estro de ovejas Rideau Arcott con diferentes tratamientos para la sincronización del estro (Media $\pm$ error estándar). .....	94
Cuadro 11. Concentraciones plasmáticas de progesterona ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) de los días 7, 11, 13, 17, 24, 34 y 40 post estro de ovejas Rideau Arcott (Media $\pm$ error estándar). .....	97
Cuadro 12. Prueba de Tajima (D) del gen ISG15. ....	101

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1. Número de documentos por año..... 13
- Figura 2. Visualización de colaboración de países con mayor número de publicaciones relacionadas con los temas de búsqueda mediante el uso del programa VOSviewer®..... 15
- Figura 3. Visualización del mapa de coautoría mediante el uso del programa VOSviewer®..... 21
- Figura 4. Mapa de red de las temáticas de las 150 palabras seleccionadas agrupadas en clústeres. .... 23

### CAPÍTULO 2

- Figura 5. Mecanismo de acción del IFN $\tau$ . RP: receptor de progesterona; RE1: receptor de estradiol tipo 1; ROX: receptor de oxitocina; IFNAR: receptor alfa de interferón; PGF2 $\alpha$ : prostaglandina F2 alfa; E2: estradiol; P4: progesterona; COX2: prostaglandina-endoperóxido sintasa 2; IRF2: factor regulador de interferón. .... 41
- Figura 6. Vías de señalización del interferón tau en el epitelio endometrial ovino. IFN $\tau$ : Interferón tau; IFNAR: receptor alfa de interferón; STAT: transductor de señal y activador de la transcripción; IRF9: factor regulador de interferón 9; ISGF3: factor del gen estimulado por interferón 3; ISG: genes estimulados por interferón; Mx: gen de resistencia al mixovirus; OAS: 2'-5'-oligoadenilato sintetasa; RSAD2: Dominio radical S-adenosil metionina 2; ISG15: gen estimulado por el interferón 15..... 42

### CAPÍTULO 3

Figura 7. Distribución de los tratamientos de sincronización de estro utilizados en ovejas de pelo. ....	55
Figura 8. Curvas de supervivencia de inicio del estro, formadas por los estimadores de supervivencia de Kaplan-Meier a diferentes tiempos por tratamiento. T1: CIDR® + PGF2α; T2: CIDR® + PGF2α + eCG; T3: CIDR® + PGF2α + eCG + 1 CIDR® 7-17d; T4: CIDR® + PGF2α + eCG + 1 CIDR® 7-34d. Long Rank (p=0.0319).....	61
Figura 9. Amplificación del gen TP-1 en ovejas de pelo. Carril 1: MM= marcador molecular, carriles 1-7 muestras amplificadas (507 pb) y carril 8 testigo negativo.....	66
Figura 10. Polimorfismos del gen TP-1 en las posiciones 219, 379, 449 y 514 de dicho gen en ovejas de pelo.....	67
Figura 11. Polimorfismos del gen TP-1 en las posiciones 53, 106 y 130 de la proteína en ovejas de pelo. ....	68

### CAPÍTULO 4

Figura 12. Distribución de los tratamientos de sincronización de estro utilizados en ovejas Rideau Arcott. ....	88
Figura 13. Curvas de supervivencia para el inicio del estro en ovejas Rideau Arcott de los tratamientos, formadas por los estimadores de supervivencia de Kaplan-Meier a diferentes tiempos por tratamiento (p<0.05). LOG RANK (p=0.03482). T1: CIDR Y PGF2α; T2: CIDR y PGF2α + 2 CIDR; T3: CIDR, PGF2α y eCG y T4: CIDR, PGF2α y eCG + 2 CIDR. ....	95

Figura 14. Amplificación del gen ISG15 en ovejas Rideau Arcott (571 pb). Carril 1: MM= marcador molecular, carriles 2-13 muestras amplificadas (571 pb) y carril 14: testigo negativo del gen ISG15. ....	98
Figura 15. Polimorfismos del gen ISG15 en las posiciones 723 (en la tercera posición del codón); 857 (en la segunda posición del codón) y 957 (en la tercera posición del codón) en ovejas Rideau Arcott. ....	99
Figura 16. El polimorfismo del gen ISG15 con cambio en la posición (857; A>G) en ovejas Rideau Arcott. Posición (857; A>G) = lisina por arginina (K →R). ...	100

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La oveja doméstica ha adquirido diversos roles en la civilización humana (Campos *et al.*, 2020) y su importancia explica su extensa distribución mundial (Thornton, 2010). De acuerdo con datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura en 2019 se produjo aproximadamente 9,300,000 ton de carne ovina en el mundo (OCDE-FAO, 2018). En los últimos cinco años, la producción ovina ha aumentado en México, esto se debe a la creciente demanda de carne, y en la actualidad, la cría de ovejas contribuye significativamente a la economía rural, principalmente en el centro de México (Vázquez-García, 2013). México produjo 64,758 ton de carne ovina en 2020 (SIAP, 2021). La producción de razas (exóticas) en México ha incrementado la productividad y ha propiciado el reemplazo de ovinos criollos en los últimos 80 años (Parsons y Nicholson, 2017). Los aumentos de la producción ganadera han sido impulsados principalmente por los avances científicos y tecnológicos en reproducción, nutrición y sanidad animal (Thornton, 2010). El uso de biotecnologías reproductivas puede incrementar los parámetros reproductivos en las unidades de producción (Ferreira-Silva *et al.*, 2017). Se ha demostrado que los protocolos para sincronizar el estro en ovejas ayudan a incrementar la eficiencia reproductiva en ovejas (Cuadro *et al.*, 2018), principalmente con el uso de hormonas tales como la gonadotropina coriónica equina (eCG) y la progesterona (P4; de Graaff y Grimard, 2018). Los protocolos más comunes para la sincronización del estro en ovinos incluyen el uso de progestágenos en combinación con eCG y prostaglandinas F2a (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2020). Los progestágenos elevan las concentraciones de progesterona en sangre, esto reduce la secreción de LH y por tanto el mantenimiento de folículos grandes que se vuelven

atrésicos, dando paso al reclutamiento de una nueva onda folicular (Adams, 1999; Campbell *et al.*, 1995). La eCG se ha convertido en un elemento esencial en los protocolos porque asegura un intervalo ovulación-inseminación corto por su efecto en el desarrollo folicular (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2020).

Existen diversos elementos que intervienen en el rendimiento reproductivo de las ovejas entre los que se encuentran: la raza, genética, época del año, y estado nutricional (Petrovic *et al.*, 2012). Evitar la pérdida de embriones durante el inicio de la gestación es transcendental para mejorar los parámetros reproductivos. Alrededor de 30-50% de la pérdida embrionaria ocurre durante el inicio de la gestación (Reynolds *et al.*, 2014; Bairagi *et al.*, 2018). La muerte embrionaria es un problema persistente, la mayoría de las veces, se desconoce las razones ya que ocurre en etapas muy tempranas de la gestación o durante el período de preimplantación (Chundekkad *et al.*, 2020). Durante esa etapa de la gestación, el diálogo entre el conceptus y el útero materno implica la señalización para el reconocimiento materno de la gestación a medida que se establece el escenario para la implantación y la placentación (Madan, 2011). Un método viable para prevenir la mortalidad embrionaria es evitar que ocurra la luteólisis, esto se puede lograr administrando P4 para auxiliar al embrión a secretar IFN- $\tau$  (Ealy y Wooldridge, 2017). Comprender las vías de señalización celular es fundamental para mejorar el desarrollo embrionario, la implantación y la placentación, lo cual amplía así la probabilidad de nacimiento (Wang *et al.*, 2016). Es importante establecer programas de mejora genética, en los que se conozca a fondo los genes relacionados con los parámetros reproductivos (Notter, 2012). Dos genes importantes que están involucrados en el inicio de la gestación son: TP-1 (Imakawa *et al.*, 2017) e ISG15 (Yang *et al.*, 2020). Las herramientas de

genética molecular son un recurso importante para mejorar la eficiencia reproductiva, ya que pueden tener un impacto de gran trascendencia en la producción ganadera las próximas décadas (FAO, 2007). Por lo anterior, el objetivo general del presente estudio fue evaluar la influencia de hormonas exógenas en variables reproductivas, en la medición de niveles séricos de estradiol y progesterona y la identificación de polimorfismos en los genes *TP-1* e *ISG15* de ovejas.

### Literatura citada

- Adams, G. P. (1999). Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 54, 17–32.
- Bairagi, S., Grazul-Bilska, A. T., Borowicz, P. P., Reyaz, A., Valkov, V., & Reynolds, L. P. (2018). Placental development during early pregnancy in sheep: Progesterone and estrogen receptor protein expression. *Theriogenology*, 114, 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.002>
- Campbell, B. K., Scaramuzzi, R. J., & Webb, R. (1995). Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 49, 335–350.
- Campos, E., Cuéllar, J., Salvador, O., García-Trejo, E. A., & Pereira, F. (2020). The genetic diversity and phylogeography of Mexican domestic sheep. *Small Ruminant Research*, 187, 106109. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106109>
- OCDE-FAO, (2018). En OECD & Food and Agriculture Organization of the United Nations, *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2017-2026* (pp. 1–15). OECD. [https://doi.org/10.1787/agr\\_outlook-2017-10-es](https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2017-10-es)
- Chundekkad, P., Błaszczuk, B., & Stankiewicz, T. (2020). Embryonic mortality in sheep: A review. *Turk J Vet Anim Sci*, 7.
- Cuadro, F., dos Santos-Neto, P. C., Pinczak, A., Barrera, N., Crispo, M., & Menchaca, A. (2018). Serum progesterone concentrations during FSH superstimulation of the first follicular wave affect embryo production in sheep. *Animal Reproduction Science*, 196, 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.011>
- de Graaff, W., & Grimard, B. (2018). Progesterone-releasing devices for cattle estrus induction and synchronization: Device optimization to anticipate shorter treatment durations and new device developments. *Theriogenology*, 112, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.025>

- Ealy, A. D., & Wooldridge, L. K. (2017). The evolution of interferon-tau. *Reproduction*, 154(5), F1–F10. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0292>
- FAO. 2007 Global plan of action for animal genetic resources and the Interlaken Declaration. Int. technical conf. on animal genetic resources for food and agriculture, Interlaken, Switzerland, 3–7 September 2007, Rome, Italy: FAO.
- Ferreira-Silva, J., Basto, S., Tenório Filho, F., Moura, M., Silva Filho, M., & Oliveira, M. (2017). Reproductive performance of postpartum ewes treated with insulin or progesterone hormones in association with ram effect. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(4), 610–616. <https://doi.org/10.1111/rda.12956>
- Gonzalez-Bulnes, A., Menchaca, A., Martin, G. B., & 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), 441. <https://doi.org/10.1071/RD18477>
- Imakawa, K., Bai, R., Nakamura, K., & Kusama, K. (2017). Thirty years of interferon-tau research; Past, present and future perspective. *Animal Science Journal*, 88(7), 927–936. <https://doi.org/10.1111/asj.12807>
- Madan, P. (2011). Arrest or Survive. En *Comprehensive Biotechnology* (pp. 469–476). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00283-X>
- Notter, D. R. (2012). Genetic improvement of reproductive efficiency of sheep and goats. *Animal Reproduction Science*, 130(3–4), 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.008>
- Parsons, D., & Nicholson, C. F. (2017). Assessing policy options for agricultural livestock development: A case study of Mexico's sheep sector. *Cogent Food & Agriculture*, 3(1), 1313360. <https://doi.org/10.1080/23311932.2017.1313360>
- Petrovic, M., Caro-Petrovic, V., Ruzic-Muslic, D., Maksimovic, N., Ilic, Z., Milosevic, B., & Stojkovic, J. (2012). Some important factors affecting fertility in sheep. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 28(3), 517–528. <https://doi.org/10.2298/BAH1203517P>
- Reynolds, L. P., Borowicz, P. P., Palmieri, C., & Grazul-Bilska, A. T. (2014). Placental Vascular Defects in Compromised Pregnancies: Effects of Assisted Reproductive Technologies and Other Maternal Stressors. En L. Zhang & C. A. Ducsay (Eds.), *Advances in Fetal and Neonatal Physiology* (Vol. 814, pp. 193–204). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1031-1\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1031-1_17)
- Thornton, P. K. (2010). Livestock production: Recent trends, future prospects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), 2853–2867. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0134>
- Vázquez-García, V. (2013). Sheep Production in the Mixed-Farming Systems of Mexico: Where Are the Women? *Rangelands*, 35(6), 41–46. <https://doi.org/10.2111/RANGELANDS-D-13-00029.1>

Wang, X., Wu, G., & Bazer, F. W. (2016). MTOR. En *Molecules to Medicine with mTOR* (pp. 23–35). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802733-2.00016-5>

Yang, L., Li, N., Zhang, L., Bai, J., Zhao, Z., & Wang, Y. (2020). Effects of early pregnancy on expression of interferon-stimulated gene 15, STAT1, OAS1, MX1, and IP-10 in ovine liver. *Animal Science Journal*, 91(1). <https://doi.org/10.1111/asj.13378>

# CAPITULO 1. GENES INVOLUCRADOS CON LA GESTACIÓN EN LA OVEJA: UN ENFOQUE BIBLIOMÉTRICO

## 1.1 RESUMEN

La pérdida de gestaciones en el desarrollo embrionario y fetal es la principal causa de mermas en los parámetros reproductivos en animales de interés pecuario. El presente estudio tuvo como objetivo identificar las características de la producción científica con los documentos publicados en revistas indizadas en el Science Citation Index Expanded (SCIE) relacionados con la temática de genes involucrados con la gestación en la oveja, mediante el uso de algunos indicadores bibliométricos unidimensionales y multidimensionales, y el análisis de co-palabras. Los registros bibliográficos se obtuvieron en el SCIE de la Colección Principal del Web de la Ciencia (WoS) y la estrategia de búsqueda que se utilizó fue "sheep and gene and pregnancy". No se colocaron filtros adicionales a la búsqueda. Los documentos encontrados se recuperaron en formato (.txt) para su posterior procesamiento mediante el software VOSviewer®. Se realizó un análisis de co-ocurrencia de palabras en el título, resumen, palabras clave de autor y palabras clave plus. Se analizaron un total de 819 documentos, correspondientes a la búsqueda realizada en WoS durante el periodo 1991-2020. Se encontraron contribuciones de 52 países. El total de autores que firman los 819 documentos fue de 3342. El conjunto de las publicaciones tiene un índice h de 82. El promedio de citas por documento fue de 33.61. Este análisis bibliométrico proporcionó una visión general básica de las publicaciones de investigación referente a los genes *IFN $\tau$*  e *ISG15* involucrados con la gestación en ovejas.

**Palabras clave:** gestación, genes, oveja, bibliometría, coautoría, co-ocurrencia.

## 1.2 ABSTRACT

The loss of pregnancies in embryonic and fetal development is the main cause of reductions in reproductive parameters in animals of livestock interest. The present study aimed to identify the characteristics of scientific production with the documents published in journals indexed in the Science Citation Index Expanded (SCIE) related to the subject of genes involved with pregnancy in sheep, through the use of some bibliometric indicators, one-dimensional and multidimensional and the analysis of co-words. The bibliographic records were obtained in the SCIE of the Main Collection of the Web of Science (WoS) and the search strategy that was used was “sheep and gene and pregnancy”. No additional filters were placed on the search. The documents found were retrieved in (.txt) format for further processing using the VOSviewer® software. A word co-occurrence analysis was performed in the title, abstract, author keywords and plus keywords. A total of 819 documents were analyzed, corresponding to the search carried out in WoS during the period 1991-2020. Contributions from 52 countries were found. The total number of authors who signed the 819 documents was 3,342. All the publications have an h-index of 82. The average number of citations per document was 33.61. This bibliometric analysis provided a basic overview of the research publications regarding genes involved with gestation in sheep.

**Keywords:** pregnancy, genes, sheep, bibliometrics, co-authorship, co-occurrence.

### 1.3 INTRODUCCIÓN

En México, actualmente se está avanzando hacia la utilización de biotecnologías para reproducir animales de alto valor genético (Ugalde, 2014). La conciencia para realizar un mejoramiento de la actividad pecuaria tiene una difusión importante entre los productores que buscan optimizar las características productivas y reproductivas de la especie ovina (Duica *et al.*, 2007). El uso de biotecnologías reproductivas adecuadas puede contribuir a incrementar los parámetros reproductivos en las unidades de producción, lo que apunta a que el potencial reproductivo de las ovejas no se ha investigado completamente (Ferreira-Silva *et al.*, 2017). Aunque Letelier *et al.* (2011) indican que hay una necesidad para identificar los factores que limitan el éxito de la reproducción asistida, tanto directa como indirectamente, ya que es esencial para la utilización de otras biotecnologías reproductivas.

Existen diversos factores que pueden intervenir negativamente en la eficiencia reproductiva (Moraes *et al.*, 2009); la pérdida de gestaciones durante el desarrollo embrionario y fetal es la principal causa de mermas en los parámetros reproductivos en animales de interés pecuario (Diskin y Morris, 2008). Esto se ha relacionado con alteraciones en la interacción endometrio-embrión y/o el apoyo hormonal inadecuado para llevar a cabo la gestación (Raheem, 2017). Aproximadamente entre 30-50% de la pérdida embrionaria ocurre durante la gestación temprana (Reynolds *et al.*, 2014; Bairagi *et al.*, 2018). Estas pérdidas interfieren en el rendimiento reproductivo mediante la prolongación de los intervalos entre partos y disminución de la prolificidad (Diskin y Morris, 2008). Por esta razón, es necesario estudiar las señales celulares y moleculares que codifican la receptividad e implantación en el útero durante el reconocimiento

materno de la gestación (Spencer *et al.*, 2004), el cual requiere la eliminación del mecanismo luteolítico endometrial por parte del embrión para conservar la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo (Spencer *et al.*, 2016). En ruminantes, el interferón tau (IFN $\tau$ ) es la proteína que inicia el reconocimiento materno de la gestación. El IFN $\tau$  es secretado antes de la implantación y su función es actuar en el epitelio uterino para regular la disminución de expresión del receptor de estrógeno tipo 1 y del receptor de oxitocina; esto elimina los pulsos luteolíticos de prostaglandina F2-alfa, PGF $\alpha$  (Bazer, 2013). Además, el IFN $\tau$  es liberado en la vena uterina y tiene acciones endocrinas para estimular los genes estimulados por el IFN $\tau$  (ISG) en los tejidos adyacentes (Spencer y Hansen, 2015).

Hoy en día el desarrollo de la comunicación científica y las redes sociales requieren estudiar la medición de la producción científica (Ball, 2018c). La evaluación de la productividad, la producción académica y su repercusión medida por las citas, es más necesaria cuanto mayor es la cantidad de producción académica publicada (Ball, 2018b). La calidad y la evaluación de los resultados académicos es de gran interés para los científicos, pero también para los dirigentes académicos y los formuladores de políticas, sin mencionar a todos los tomadores de decisiones en posiciones estratégicas en universidades y centros de investigación (Ball, 2018a). Los estudios bibliométricos son una forma eficiente para identificar las tendencias y temas emergentes en un área específica de la ciencia (Liberatore y Herrero-Solana, 2013). Este campo de estudio se encuentra actualmente en su etapa precursora, lo cual contribuye principalmente a los campos de la medicina, la informática y las ciencias de la salud (Liu y Avello, 2020). Y este tipo de estudio es abordado por una serie de indicadores bibliométricos

unidimensionales y multidimensionales (Van Raan y Tijssen, 1993; Sanz y Martin, 1997), a partir de la investigación científica publicada en revistas de corriente principal (Salager-Meyer, s/f); apoyado con el análisis de co-palabras, estudio de las apariciones vinculadas de dos términos en un escrito con la finalidad de identificar la estructura conceptual y temática de un dominio científico (Galvez, 2018).

Con la finalidad de facilitar la interpretación y el análisis usualmente se utilizan herramientas como el Diagrama de Red (Avila-Toscano, 2018), en el cual se muestran las relaciones entre las palabras de cada grupo, lo cual revela el nivel de asociación entre las palabras clave que pertenecen a cada uno de ellos (Serrano-Bedia *et al.*, 2013). El presente estudio tuvo como objetivo identificar las características de la producción científica con los documentos publicados en revistas indizadas en el Science Citation Index Expanded (SCIE) relacionados con la temática de los genes involucrados con la gestación en la oveja, mediante el uso de algunos indicadores bibliométricos unidimensionales y multidimensionales, y el análisis de co-palabras.

#### **1.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

Los registros bibliográficos para realizar el estudio bibliométrico se obtuvieron a partir de una búsqueda en el SCIE de la Colección Principal del Web de la Ciencia (WOS; Clarivate, 2021b); una importante base de datos mundial de citas de revistas que se utiliza para la evaluación bibliométrica (Cui y Zhang, 2018), mantenida actualmente por la empresa Clarivate Analytics (Clarivate 2021a). Y la estrategia de búsqueda que se utilizó fue “sheep and gene and pregnancy” presentes en el título, resumen, palabras

clave de autor y palabras clave plus. No se colocaron filtros adicionales a la búsqueda. Los documentos encontrados se recuperaron en formato (.txt) para su posterior procesamiento mediante el software VOSviewer® Versión 1.6.13 (0) (Centre for Science and Technology Studies, 2019), que se utiliza para crear y visualizar mapas, con el criterio “Visualization of Similarities”; método propuesto por van Eck y Waltman (2010) como alternativa al escalado multidimensional para visualizar similitudes entre objetos. Se realizó un análisis de co-ocurrencia de palabras en el título, resumen, palabras clave de autor y palabras clave plus (Zhang *et al.*, 2016).

De los 819 documentos encontrados, se identificaron un total de 3935 palabras clave, para simplificar se consideraron únicamente las palabras clave que superaron un umbral de frecuencia  $\geq 10$  y asegurar que aparecieran solo las palabras clave con mayor peso (150). Con estos registros, se construyó una matriz cuadrada de N x N elementos, o matriz de co-ocurrencia entre pares de palabras clave (Galvez, 2018). Se obtuvo una matriz de similitud mediante la aplicación del procedimiento fuerza de asociación. Además, con los datos de adscripción de los autores, se determinó la colaboración científica en el periodo evaluado y se realizó una red de la colaboración entre los países que publican sobre el tema y un mapa de coautoría. Para mostrar las características de los documentos analizados, se utilizaron los indicadores unidimensionales y multidimensionales listados en el Cuadro 1, los cuales se consideran adecuados para caracterizar la investigación científica referente a los genes involucrados con la gestación de la especie ovina que fue indizada en el SCIE en el periodo 1991-2020.

Cuadro 1 Indicadores bibliométricos utilizados.

Unidimensionales	Multidimensionales
Crecimiento de la literatura	Análisis de co-palabras
Tipología documental	Colaboración científica
Idioma de publicación	Coautoría
Autores con mayor producción	
Revistas de publicación	

## 1.5 RESULTADOS

### 1.5.1 Crecimiento de la literatura

En la Figura 1 se observan los documentos por año relacionados con la búsqueda, con un promedio de 28 documentos por año. En 1996, se publicaron 20 documentos relacionados a las palabras de búsqueda, mientras que en el 2019 se publicaron 36 documentos. La línea de tendencia permite apreciar que las publicaciones han aumentado conforme pasan los años.



Figura 1. Número de documentos por año.

### 1.5.2 Tipología científica e idioma de publicación

Se analizaron un total de 819 documentos, correspondientes a la búsqueda realizada en WoS durante el periodo 1991-2020. Incluyen artículos científicos (762), revisiones (55) y capítulos de libro (2). El idioma más utilizado para publicar es el inglés, con más

de 98% de las publicaciones (808), mientras que también hay publicaciones en francés (2), alemán (2), turco (2), portugués (2), español (2), chino (1) y polaco (1).

### 1.5.3 Colaboración científica entre autores, países e instituciones

Se encontraron contribuciones de 52 países. En la Figura 2 se observan los países que más destacan en cuanto a las publicaciones relacionadas con la búsqueda realizada (Australia, Inglaterra, China, Francia, Alemania y USA). El líder mundial tanto en economía como en ciencia es USA, país que ha publicado la mayor cantidad de artículos en genes involucrados con la gestación en ovejas. En el lado izquierdo del mapa, se aprecia a México, los investigadores mexicanos han contribuido con 5 publicaciones y solo hay colaboración con los investigadores de USA.

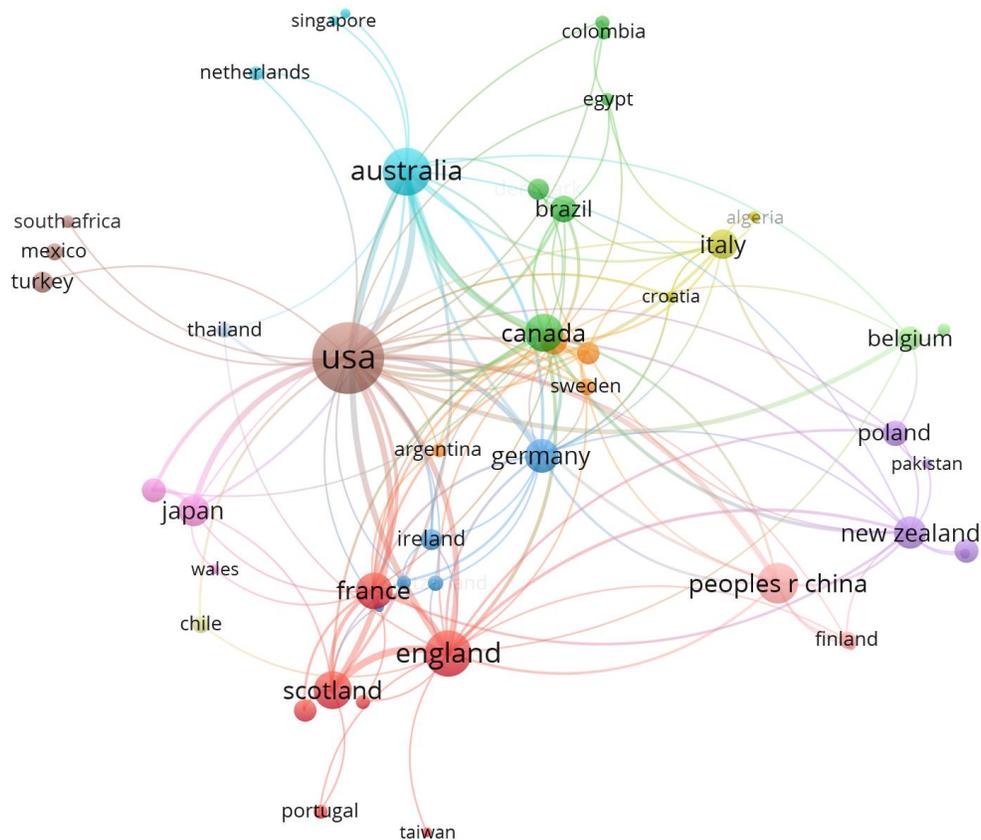


Figura 2. Visualización de colaboración de países con mayor número de publicaciones relacionadas con los temas de búsqueda mediante el uso del programa VOSviewer®.

#### 1.5.4 Instituciones con mayor aportación de publicaciones

En el Cuadro 2 se pueden observar las 10 instituciones que más publicaciones generan relacionadas con la búsqueda que se realizó, además de su posición en el ranking académico de universidades del mundo. Destacan las universidades de Texas (A & M) con 71 documentos y un promedio de citas por documento de 72.08; Missouri de USA ha publicado 51 documentos con un promedio de citas de 53.64 y Adelaida de Australia con 40 documentos y un promedio de citas por documento de 34.98. En la posición cinco se encuentra el Instituto Nacional para la Investigación Agronómica (INRA) de Francia. Otro punto a destacar es que 9 de las 10 instituciones son universidades.

Cuadro 2. Principales instituciones con mayor número de publicaciones.

Institución	País	Documentos	C	PC	ARWU	QS
Universidad de Texas (A & M)	USA	71	5117	72.08	151-200	189
Universidad de Missouri	USA	51	2735	53.64	151-200	551-560
Universidad de Adelaida	Australia	40	1399	34.98	151-200	106
Universidad de Florida	USA	33	1404	42.57	201-300	448
INRA	Francia	31	1545	49.84	-	-

Institución	País	Documentos	C	PC	ARWU	QS
Universidad de Nottingham	Inglaterra	28	1645	58.76	101-150	96
Universidad de Monash	Australia	25	428	17.12	85	58
Universidad de Toronto	Canadá	20	539	26.95	23	29
Universidad de Melbourn	Australia	18	365	20.32	35	38
Universidad del Estado de Washington	USA	17	805	47.39	16	68

C: Número de citas; PC: Promedio de citas; ARWU: Ranking académico de universidades del mundo; QS: Clasificación universitaria mundial.

### 1.5.5 Revistas de publicación y artículos más citados

Las revistas que más documentos publican de los temas relacionados con la búsqueda realizada se encuentran en el Cuadro 3. Destaca *Biology of reproduction* que se encuentra en el cuartil 1 de la categoría *Reproductive Biology* con el 10.211% del total de documentos y un factor de impacto en 2019 de 3.322. El artículo que más citas tiene (244) de esta revista es: *Temporal and spatial alterations in uterine estrogen-receptor and progesterone-receptor gene-expression during the estrous-cycle and early-pregnancy in the ewe* escrito en 1995 (Cuadro 3).

En la segunda posición se encuentra la revista *Theriogenology* en el cuartil 1 de la categoría *Veterinary Sciences* con el 5.516% de los documentos, su factor de impacto es de 2.094.

El artículo más citado de esta revista es: In vitro culture of sheep embryos without coculture - successes and perspectives escrito en 1992. Tres de las diez revistas con más documentos publicados se encuentran en el primer cuartil de su categoría.

Cuadro 3. Principales revistas con más documentos publicados en el tema de búsqueda y artículo más citado.

Datos de la revista							Artículo más citado			
Revista	D	% D	FI	Categoría	Cuartil	Año	Autores	Título	Citas	
			2019	JCR						
Biology of reproduction	87	10.211	3.322	Reproductive Biology	1	1995	Spencer, T.E.; Bazer, F.W.	Temporal and spatial alterations in uterine estrogen-receptor and progesterone-receptor gene-expression during the estrous-cycle and early-pregnancy in the ewe	244	
Theriogenology	47	5.516	2.094	Veterinary sciences	1	1992	Walker, S.K.; Heard, T.M.; Seamark, R. F.	Invitro culture of sheep embryos without coculture - successes and perspectives	196	
Endocrinology	37	4.343	3.934	Endocrinology & metabolism	2	2008	Oliveira, J.F.; Henkes, L.E.; Ashley, R.L.; Purcell, S.H.; Smirnova, N.P.; Veeramachaneni, D.N.R.; Anthony, R.V.; Hansen, T.R.	Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN-tau release from the uterine vein	119	
Reproduction	34	3.991	3.206	Reproductive biology	2	2008	Spencer, T.E.; Sandra, O.; Wolf, E.	Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches	211	

Datos de la revista							Artículo más citado			
Revista	D	% D	FI	Categoría	Cuartil	Año	Autores		Título	Citas
			2019	JCR						
Reproduction fertility and development	32	3.756	1.721	Zoology	2	2007	Spencer, T.E.; Johnson, G.A.; Bazer, F.W.; Burghardt, R.C.; Palmarini, M.	Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: Roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses	213	
Journal of endocrinology	27	3.169	4.041	Endocrinology & metabolism	2	2001	Thomas, L.; Wallace, J.M.; Aitken, R.P.; Mercer, J.G.; Trayhurn, P.; Hoggard, N.	Circulating leptin during ovine pregnancy in relation to maternal nutrition, body composition and pregnancy outcome	107	
Molecular reproduction and development	24	2.817	2.823	Biochemistry & molecular biology	3	2004	Gutierrez-Adan, A.; Rizos, D.; Fair, T.; Moreira, P.N.; Pintado, B.; De La Fuente, J.; Boland, M.P.; Loneragan, P.	Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro	143	
Journal of animal science	21	2.465	2.092	Agriculture, dairy & animal science	1	1995	Pomp, D.; Good, B.A.; Geisert, R.D.; Corbin, C.J.; Conley, A.J.	Sex identification in mammals with polymerase chain-reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or day- 11 pig embryos	111	
Animal reproduction science	20	2.347	1.66	Agriculture, dairy & animal science	2	2004	Spencer, T.E.; Burghardt, R.C.; Johnson, G.A.; Bazer, F.W.	Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy	183	
Placenta	20	2.347	3.177	Reproductive biology	2	2007	Carter, A.M.	Animal models of human placentation - A review	336	

De la búsqueda realizada, el artículo con más citas (502), es el de Sinclair *et al* (Sinclair *et al.*, 2007) que trata de: DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status, se

publicó en: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Seis de los diez artículos mencionados en el Cuadro 3 tratan temas relacionados con los genes involucrados en la gestación. Dos artículos tienen  $\geq 300$  citas y 12 artículos tienen  $\geq 200$  citas. La publicación más antigua encontrada es de Charlier *et al.* (1991) y trata de: Cloning and structural analysis of two distinct families of ovine interferon- $\alpha$  genes encoding functional class II and trophoblast (oTP)  $\alpha$ -interferons; esta publicación tiene 40 citas en total.

#### 1.5.6 Autores con mayor producción

El total de autores que firman los 819 documentos es de 3342 con un máximo 25 autores en un artículo y con un promedio de cuatro autores por artículo. En el Cuadro 4 se muestran los cinco autores más importantes por su producción o impacto, el número de citas de cada autor y la institución de adscripción.

Cuadro 4. Autores con más publicaciones de temas relacionados con la búsqueda.

<b>Autor (Índice h)</b>	<b>Docs</b>	<b>Citas</b>	<b>Institución</b>	<b>Temas investigación</b>
Spencer, Thomas E. (SCIE 42)	67	5286	University of Missouri, E.E.U.U.	Biología de la reproducción, endocrinología, fertilidad
Bazer, Fuller W. (SCIE 39)	61	4694	Texas A&M University, E.E.U.U.	Reproducción animal, endocrinología, inmunología

<b>Autor (Índice h)</b>	<b>Docs</b>	<b>Citas</b>	<b>Institución</b>	<b>Temas investigación</b>
Johnson, Greg A. (SCIE 26)	34	2704	College STN, TX, E.E.U.U.	Desarrollo placentario, interferón, implantación
Roberts, Rosalyn M. (SCIE 27)	31	2175	Melbourne, VIC, Australia	Expresión génica, Interferón tau, gestación
Burghardt, Robert C. (SCIE 22)	27	2733	Texas A&M University E.E.U.U.	Fisiología, Establecimiento y mantenimiento de la gestación

Destacan Spencer, Thomas E. y Bazer, Fuller W. con 67 y 61 documentos respectivamente. El artículo: Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy escrito por Spencer y Bazer (2002). Este artículo tiene 269 citas.

#### 1.5.7 Coautoría

En la Figura 3 se puede observar el mapa de coautoría, se pueden apreciar diez agrupaciones, en la agrupación 2 (verde) en la cual se encuentran 24 autores, están integrados los autores (Thomas Spencer y Fuller Bazer) con más documentos publicados de los temas relacionados con la búsqueda realizada y colaboran principalmente con Megan Minten de la agrupación 6 (verde agua); 9 (rosa y 11 autores); 5 (lila y 16 autores) y 7 (morado y 15 autores).

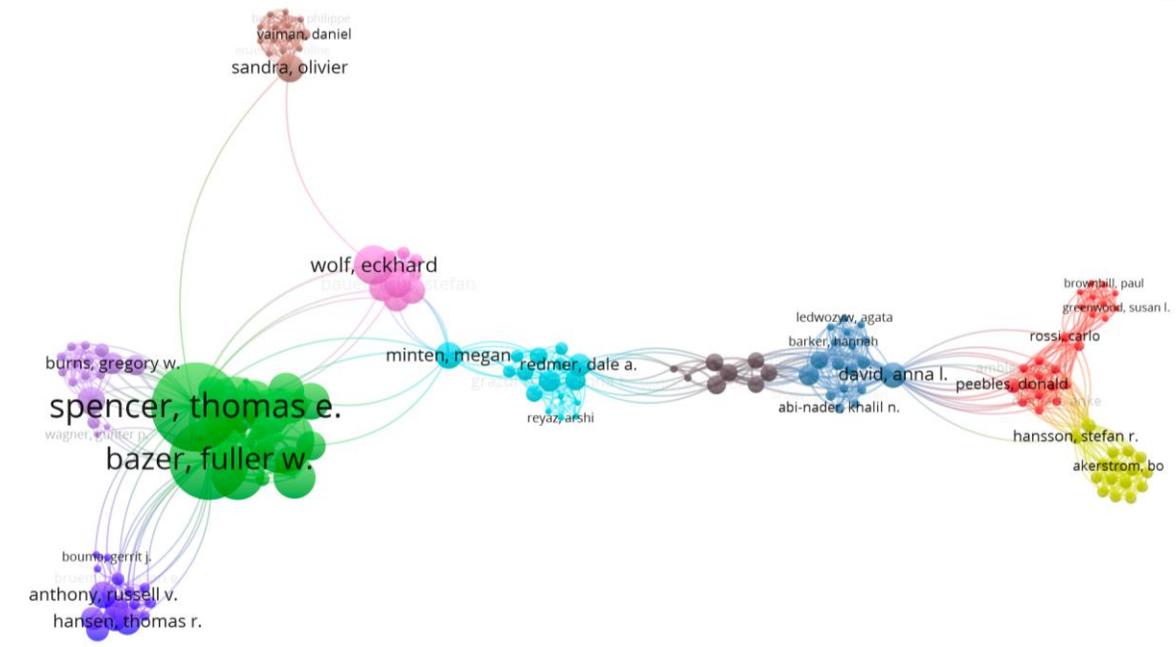


Figura 3. Visualización del mapa de coautoría mediante el uso del programa VOSviewer®.

### 1.5.8 Impacto de la investigación

El índice H (también conocido como factor de Hirsch o indicador de Hirsch) es inicialmente una combinación del número de publicaciones y la frecuencia de las citas (Ball, 2018a). El conjunto de las publicaciones tiene un índice h de 82; este valor se basa en una lista de publicaciones clasificadas en orden descendente por el recuento de veces citado. Un índice de h significa que hay documentos h que se han citado al menos h veces (Dorta-González y Dorta-González, 2010).

El promedio de citas por documento es de 33.61; este es el número promedio de citas para todos los artículos en el conjunto de resultados. El número total de veces que se ha citado a todos los elementos del conjunto de resultados obtenido es 27.561. El artículo

más citado es: DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status, con 502 citas.

#### 1.5.9 Temáticas de la investigación y análisis de co-palabras

En la Figura 4 se pueden visualizar las 150 palabras clave seleccionadas, el tamaño de los círculos de las palabras clave es proporcional a la frecuencia de ocurrencias de los términos y a su peso calculado con “índice de similaridad o fuerza de atracción (FA, por sus siglas en inglés Streeng Atraction), a través del cual los términos se relacionaron entre sí. El aglutinado en el centro del mapa indica una alta interrelación de las palabras clave que lo integran, mientras que los grupos situados en los bordes del mapa indican una menor interrelación entre las palabras clave. Se formaron 4 grupos identificados por cada color; grupo 1 (rojo), grupo 2 (verde), grupo 3 (azul) y grupo 4 (amarillo).

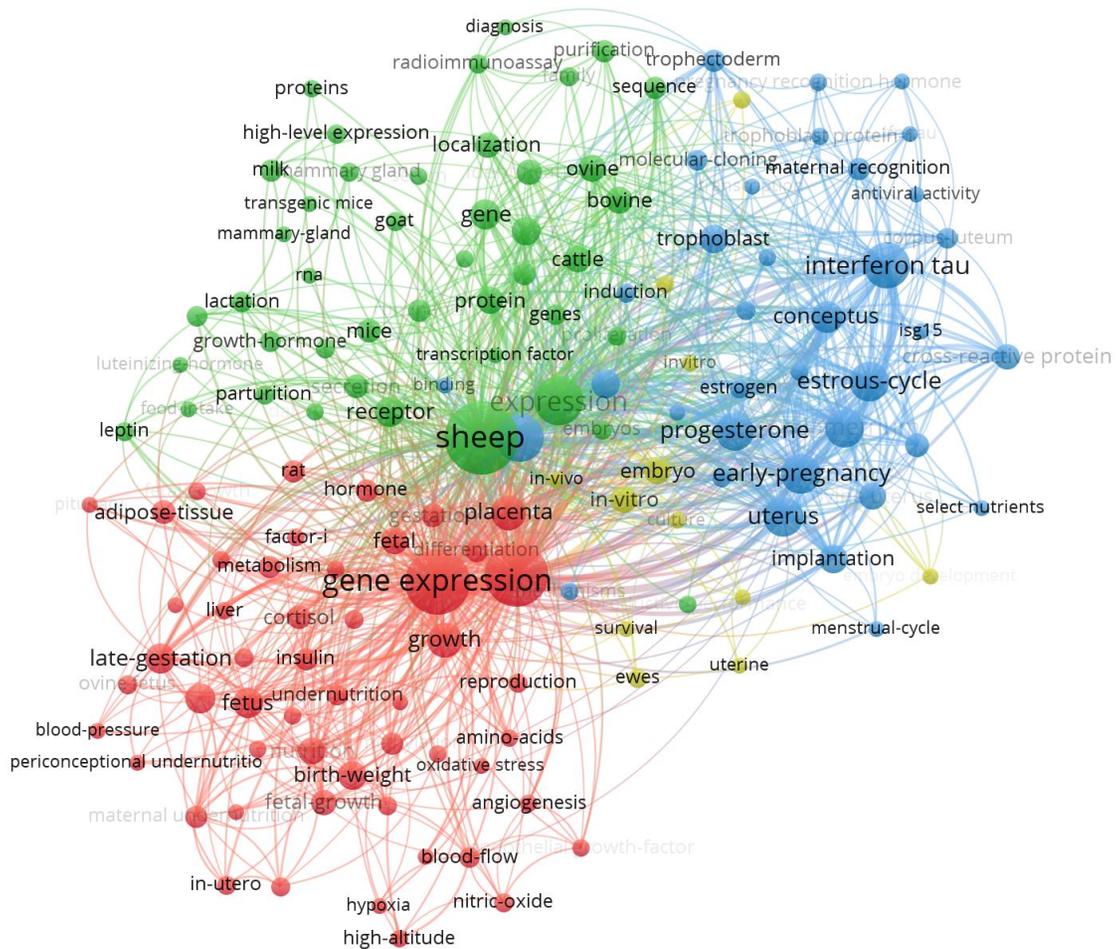


Figura 4. Mapa de red de las temáticas de las 150 palabras seleccionadas agrupadas en clústeres.

La agrupación 1 (rojo) está compuesta por un total de 55 palabras entre las que destacan expresión génica, crecimiento, gestación, placenta y reproducción por su ocurrencia. El artículo de esta agrupación que más citas (502) tiene es: DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status, escrito por Sinclair *et al.*, (2007). En la agrupación 2 (verde) se integran 45 palabras entre las que destacan sheep (es la palabra con mayor ocurrencia), luego están las palabras embriones, proteína y clonación. El artículo de esta

agrupación que más citas (368) tiene es: Impacts of arginine nutrition on embryonic and fetal development in mammals, escrito por Wu *et al.* (2013). El grupo 3 (azul) se integró por 39 palabras, la palabra que más destaca en este grupo es interferón tau y algunas otras que destacan son gestación temprana, progesterona e ISG15; en este grupo se encuentran los únicos dos genes que aparecen entre las 150 palabras clave con mayor ocurrencia. El artículo de esta agrupación que más citas (269) tiene es: Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy, escrito por Spencer y Bazer (2002). En la agrupación 4 (amarillo) hay 11 palabras, las que más destacan son desarrollo embrionario e implantación. El artículo de esta agrupación que más citas (214) tiene es: Osteopontin: Roles in implantation and placentation, escrito por Johnson *et al.*, (2003).

En el Cuadro 5 se muestra una clasificación de las primeras 75 palabras clave con mayor frecuencia y su índice de similaridad FA. Las cinco palabras más frecuentes son: oveja, gestación, expresión génica, ciclo estral y gestación temprana.

Cuadro 5. Primeras 20 palabras clave con mayor frecuencia y su índice de similaridad FA.

<b>Palabra clave</b>	<b>Frecuencia (n)</b>	<b>IS (FA)</b>	<b>Palabra clave</b>	<b>Frecuencia (n)</b>	<b>IS (FA)</b>
Sheep	328	1565	Conceptus	50	356
Pregnancy	239	1198	Placenta	60	325
Gene-expression	214	972	Growth	59	290
Expression	127	657	Implantation	40	264

<b>Palabra clave</b>	<b>Frecuencia (n)</b>	<b>IS (FA)</b>	<b>Palabra clave</b>	<b>Frecuencia (n)</b>	<b>IS (FA)</b>
Estrous-cycle	83	472	Interferón-tau	42	258
Early-pregnancy	83	460	Ovine trophoblast Protein-1	41	238
Uterus	77	448	Receptor	44	237
Endometrium	70	439	Bovine	34	225
Progesterone	75	430	Trophoblast	36	224
Messenger-RNA	74	419	Cells	36	215

FA: Fuerza de atracción; n: Número palabras.

## 1.6 DISCUSIÓN

El desarrollo de investigaciones de tipo bibliométrico en el contexto de la especie ovina es aún incipiente, pero en los últimos años los estudios bibliométricos son cada vez más demandados en las diferentes áreas de la ciencia; su uso se ha extendido en los países más desarrollados a nivel científico. La bibliometría es utilizada en múltiples ramas científicas debido a que es un método confiable para calcular la productividad de las distintas áreas de la ciencia (Guo *et al.*, 2020).

El análisis bibliométrico de los documentos relacionados con ovejas y los genes involucrados con la gestación reveló que el número de artículos publicados ha

aumentado cada año. Estados Unidos es el país que más destaca por la cantidad de artículos publicados; su influencia en este campo puede estar relacionada con ventajas tecnológicas, económicas y académicas (Xie *et al.*, 2020), propias de un país líder mundial. Otro factor importante es la colaboración con investigadores de países como Australia, Alemania, Inglaterra y Francia principalmente. Esto se debe a que las instituciones tienen que más publicaciones relacionadas con la búsqueda realizada están en estos países. El impacto de la investigación realizada ha sido favorable considerando el índice h (82) y el número de citas promedio (33.61) de las publicaciones que la búsqueda arrojó. Esto indica que la investigación relacionada con los genes involucrados con la gestación en la oveja es un área de investigación próspera.

La investigación en torno al inicio de la gestación en las ovejas se ha diversificado hacia el área de biología molecular y genética con la finalidad de comprender los mecanismos involucrados (Gallardo Paffetti *et al.*, 2020; Luridiana *et al.*, 2020; Pokharel *et al.*, 2020). La producción de artículos científicos predomina en esta área de la ciencia experimental, con el incremento progresivo de documentos publicados (Edwards *et al.*, 2020; Alak *et al.*, 2020).

La visualización obtenida en el mapa bibliométrico temático nos permite vislumbrar la organización temática de las líneas de investigación importantes relacionadas con los genes involucrados con la gestación en ovejas. En el mapa de red se identifican cuatro agrupaciones, en la primera el tema principal es la expresión génica, en la segunda agrupación el tema predominante son las ovejas, mientras que en la tercera agrupación el tema predominante son los genes involucrados con la gestación y en la cuarta agrupación el tema predominante es el desarrollo embrionario. Los temas de gestación,

placentación y reproducción se han tratado por muchos autores en distintas revisiones de literatura y artículos entre los que se abordan temas como la implantación (Spencer *et al.*, 2007), desarrollo embrionario (Walker *et al.*, 1992), la función de la progesterona (Bairagi *et al.*, 2018) y el interferón tau (Bazer *et al.*, 1997) en el reconocimiento materno de la gestación (Spencer *et al.*, 2004).

La palabra sheep aparece entre algunos de los artículos más citados (Xie *et al.*, 1991; Denning *et al.*, 2001; Edwards y McMillen, 2002); en los que se tratan temas como la desnutrición materna en el periodo preconcepción y la delección del gen de la alfa (1,3) galactosil transferasa (GGTA1) y del gen de la proteína priónica (PrP); estos temas están integrados en la segunda agrupación visualizada en el mapa bibliométrico. Los temas relacionados a la tercera agrupación de palabras son tratados por artículos en los que se tocan temas como: Progesterona durante la gestación: diálogo cruzado endocrino-inmune en especies de mamíferos y el papel del estrés, Interferones y progesterona para el establecimiento y mantenimiento de la gestación: interacciones entre nuevas vías de señalización celular y la expresión de genes estimulados por interferón (IFN) en tejidos extrauterinos durante la gestación temprana en ovejas de autores (Arck *et al.*, 2007; Bazer *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2008). Podrían existir estudios importantes relacionados con el tema que no están en la base de datos WoS y, por lo tanto, no están considerados en el presente estudio. Es importante mencionar que la pertinencia, aplicabilidad y relevancia de los artículos bibliométricos pueden ser minimizada en algunos casos, ya sea por los editores de las revistas o por los autores de artículos que no se encuentren incluidos en la búsqueda realizada.

## 1.7 CONCLUSIONES

Los indicadores bibliométricos utilizados permitieron identificar las características de la producción científica con los documentos publicados en revistas indizadas en el Science Citation Index Expanded (SCIE) relacionados con la temática de los genes involucrados con la gestación en la oveja. Las revistas donde se han publicado más documentos relacionados al tema de búsqueda se encuentran en los cuartiles 1 y 2 de sus respectivas categorías. 15 de las 20 palabras clave con mayor frecuencia están relacionadas con la gestación temprana.

El estudio bibliométrico con el análisis de co-palabras en un mapa bibliométrico, específicamente en la agrupación 3 (azul), mostró que los genes Interferón tau (TP-1) y el estimulado por el interferón 15 (ISG15) y la progesterona, están altamente involucrados en el inicio de la gestación en las ovejas. Este análisis bibliométrico proporcionó una visión general básica de las publicaciones de investigación referente a la gestación y el IFN $\tau$  y el ISG15 son los genes estudiados con mayor frecuencia. Además, se mostró que Estados Unidos ha sido uno de los mayores contribuyentes en el área de estudio de la gestación.

Sería interesante realizar en un futuro un estudio sobre la temática de ciencias de la información en otras bases de datos y abarcando un periodo más extenso, para proveer la generación de un mayor conocimiento del campo; por ejemplo, genes involucrados en la gestación de ovejas como el ISG15. El presente estudio será útil para orientar a los investigadores en la selección de temas relevantes del área estudiada.

## 1.8 LITERATURA CITADA

- Alak, I., Hitit, M., Kose, M., Kaya, M. S., Ucar, E. H., Atli, Z., & Atli, M. O. (2020). Relative abundance and localization of interferon-stimulated gene 15 mRNA transcript in intra- and extra-uterine tissues during the early stages of pregnancy in sheep. *Animal Reproduction Science*, 216, 106347. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106347>
- Arck, P., Hansen, P. J., Mulac Jericevic, B., Piccinni, M.-P., & Szekeres-Bartho, J. (2007). Progesterone During Pregnancy: Endocrine?Immune Cross Talk in Mammalian Species and the Role of Stress. *American Journal of Reproductive Immunology*, 58(3), 268–279. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00512.x>
- Avila-Toscano, J. H. (2018). *Cienciometría y bibliometría: El estudio en la producción científica. Métodos, enfoques y aplicaciones de las ciencias sociales.*
- Bairagi, S., Grazul-Bilska, A. T., Borowicz, P. P., Reyaz, A., Valkov, V., & Reynolds, L. P. (2018). Placental development during early pregnancy in sheep: Progesterone and estrogen receptor protein expression. *Theriogenology*, 114, 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.002>
- Ball, R. (2018a). *Bibliometric Methods: Basic Principles and Indicators.* En *An Introduction to Bibliometrics* (pp. 15–56). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102150-7.00003-7>
- Ball, R. (2018b). *Introduction and History.* En *An Introduction to Bibliometrics* (pp. 7–14). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102150-7.00002-5>
- Ball, R. (2018c). *Preface.* En *An Introduction to Bibliometrics* (pp. 1–6). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102150-7.00001-3>
- Bazer, F. W., Spencer, T. E., & Ott, T. L. (1997). Interferon tau: A novel pregnancy recognition signal. *American Journal of Reproductive Immunology*, 37(6), 412–420.
- Bazer, Fuller W. (2013). Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(1), 23. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-23>
- Bazer, Fuller W., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Spencer, T. E., & Wu, G. (2008). Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: Interactions among novel cell signaling pathways. *Reproductive Biology*, 8(3), 179–211. [https://doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60012-6](https://doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60012-6)
- Charlier, M., Hue, D., Boisnard, M., Martal, J., & Gaye, P. (1991). Cloning and structural analysis of two distinct families of ovine interferon- $\alpha$  genes encoding functional class II and trophoblast ( $\alpha$ TP)  $\alpha$ -interferons. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 76(1–3), 161–171. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(91\)90270-3](https://doi.org/10.1016/0303-7207(91)90270-3)
- Cui, T., & Zhang, J. (2018). *Bibliometric and review of the research on circular economy*

- through the evolution of Chinese public policy. *Scientometrics*, 116(2), 1013–1037. <https://doi.org/10.1007/s11192-018-2782-y>
- Denning, C., Burl, S., Ainslie, A., Bracken, J., Dinnyes, A., Fletcher, J., King, T., Ritchie, M., Ritchie, W. A., Rollo, M., de Sousa, P., Travers, A., Wilmot, I., & Clark, A. J. (2001). Deletion of the  $\alpha(1,3)$ galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nature Biotechnology*, 19(6), 559–562. <https://doi.org/10.1038/89313>
- Diskin, M., & Morris, D. (2008). Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 260–267. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x>
- Dorta-González, P., & Dorta-González, M. I. (2010). Indicador bibliométrico basado en el índice h. *Revista española de Documentación Científica*, 33(2), 225–245. <https://doi.org/10.3989/redc.2010.2.733>
- Duica A., A., Tovío L., N., & Grajales L., H. (2007). Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de transplante de embriones bovinos. *Rev. med. vet. (Bogota)*, 14, 107–124.
- Edwards, A. K., Dunlap, K. A., Spencer, T. E., & Satterfield, M. C. (2020). Identification of Pathways Associated with Placental Adaptation to Maternal Nutrient Restriction in Sheep. *Genes*, 11(9), 1031. <https://doi.org/10.3390/genes11091031>
- Edwards, L. J., & McMillen, I. C. (2002). Impact of Maternal Undernutrition During the Periconceptional Period, Fetal Number, and Fetal Sex on the Development of the Hypothalamo-Pituitary Adrenal Axis in Sheep During Late Gestation<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 66(5), 1562–1569. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.5.1562>
- Ferreira-Silva, J., Basto, S., Tenório Filho, F., Moura, M., Silva Filho, M., & Oliveira, M. (2017). Reproductive performance of postpartum ewes treated with insulin or progesterone hormones in association with ram effect. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(4), 610–616. <https://doi.org/10.1111/rda.12956>
- Gallardo Paffetti, M., Cárcamo, J., Arias-Darraz, L., Alvear, C., & Ojeda, J. (2020). Effect of Type of Pregnancy on Transcriptional and Plasma Metabolic Response in Sheep and Its Further Effect on Progeny Lambs. *Animals*, 10(12), 2290. <https://doi.org/10.3390/ani10122290>
- Galvez, C. (2018). Análisis de co-palabras aplicado a los artículos muy citados en *Biblioteconomía y Ciencias de la Información (2007-2017)*. *Transinformação*, 30(3), 277–286. <https://doi.org/10.1590/2318-08892018000300001>
- Guo, Y., Song, Z., Cheng, X., Wang, Y., Luo, X., An, R., Wang, J., & Gao, M. (2020). Molecular and functional characterization of ovis aries IFN-epsilon. *Molecular Immunology*, 119, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.01.001>
- Johnson, G. A., Burghardt, R. C., Bazer, F. W., & Spencer, T. E. (2003). Osteopontin:

- Roles in implantation and placentation. *Biology of Reproduction*, 69(5), 1458–1471. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.020651>
- Letelier, C. A., Contreras-Solis, I., García-Fernández, R. A., Sánchez, M. A., García-Palencia, P., Sánchez, B., Ariznavarreta, C., Tresguerres, J. A. F., Flores, J. M., & Gonzalez-Bulnes, A. (2011). Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep. *Animal Reproduction Science*, 126(1–2), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.04.012>
- Liberatore, G., & Herrero-Solana, V. (2013). Caracterización temática de la investigación en Ciencia de la Información en Brasil en el período 2000-2009. *Transinformação*, 25(3), 225–235. <https://doi.org/10.1590/S0103-37862013000300005>
- Liu, Y., & Avello, M. (2020). Status of the research in fitness apps: A bibliometric analysis. *Telematics and Informatics*, 101506. <https://doi.org/10.1016/j.tele.2020.101506>
- Luridiana, S., Cosso, G., Pulinas, L., Di Stefano, M. V., Curone, G., Carcangiu, V., & Mura, M. C. (2020). New polymorphisms at MTNR1A gene and their association with reproductive resumption in sarda breed sheep. *Theriogenology*, 158, 438–444. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.006>
- Moraes, E. P. B. X., Freitas Neto, L. M., Aguiar Filho, C. R., Bezerra, F. Q. G., Santos, M. H. B., Neves, J. P., Lima, P. F., & Oliveira, M. a. L. (2009). Mortality determination and gender identification of conceptuses in pregnancies of Santa Ines ovine by ultrasound. *South African Journal of Animal Science*, 39(4), 307–312.
- Oliveira, J. F., Henkes, L. E., Ashley, R. L., Purcell, S. H., Smirnova, N. P., Veeramachaneni, D. N. R., Anthony, R. V., & Hansen, T. R. (2008). Expression of Interferon (IFN)-Stimulated Genes in Extrauterine Tissues during Early Pregnancy in Sheep Is the Consequence of Endocrine IFN- $\tau$  Release from the Uterine Vein. *Endocrinology*, 149(3), 1252–1259. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0863>
- Pokharel, K., Peippo, J., Li, M., & Kantanen, J. (2020). Identification and characterization of miRNAs during early pregnancy in domestic sheep. *Animal Genetics*, 51(5), 833–836. <https://doi.org/10.1111/age.12992>
- Raheem, K. A. (2017). An insight into maternal recognition of pregnancy in mammalian species. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.01.002>
- Reynolds, L. P., Borowicz, P. P., Palmieri, C., & Grazul-Bilska, A. T. (2014). Placental Vascular Defects in Compromised Pregnancies: Effects of Assisted Reproductive Technologies and Other Maternal Stressors. En L. Zhang & C. A. Ducsay (Eds.), *Advances in Fetal and Neonatal Physiology* (Vol. 814, pp. 193–204). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1031-1\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1031-1_17)
- Salager-Meyer, F. (s/f). Peripheral scholarly journals: From locality to globality. 23.

- Sanz, C. E., & Martin, M. C. (1997). Técnicas bibliométricas aplicadas a los estudios de usuarios. Servicio de Publicaciones Universidad Complutense. Madrid, 7, 28.
- Serrano-Bedia, A. M., López-Fernández, M. C., & Pérez-Pérez, M. (2013). Análisis de la relación entre flexibilidad en operaciones y performance empresarial mediante técnicas bibliométricas. *Revista española de Documentación Científica*, 36(4), e022. <https://doi.org/10.3989/redc.2013.4.1007>
- Sinclair, K. D., Allegrucci, C., Singh, R., Gardner, D. S., Sebastian, S., Bispham, J., Thurston, A., Huntley, J. F., Rees, W. D., Maloney, C. A., Lea, R. G., Craigon, J., McEvoy, T. G., & Young, L. E. (2007). DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19351–19356. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707258104>
- Spencer, T., & Bazer, F. (2002). Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. <https://doi.org/10.2741/SPENCER>
- Spencer, T. E., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., & Bazer, F. W. (2004). Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Animal Reproduction Science*, 82–83, 537–550. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.014>
- Spencer, Thomas E., Forde, N., & Lonergan, P. (2016). The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5941–5950. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10070>
- Spencer, Thomas E., & Hansen, T. R. (2015). Implantation and Establishment of Pregnancy in Ruminants. En R. D. Geisert & F. W. Bazer (Eds.), *Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals* (Vol. 216, pp. 105–135). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-15856-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-15856-3_7)
- Spencer, Thomas E., Johnson, G. A., Bazer, F. W., Burghardt, R. C., & Palmarini, M. (2007). Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: Roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(1), 65. <https://doi.org/10.1071/RD06102>
- Ugalde, J. R. (2014). Biotecnologías reproductivas para el siglo XXI. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(1), 33–34.
- van Eck, N. J., & Waltman, L. (2010). Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. *Scientometrics*, 84(2), 523–538. <https://doi.org/10.1007/s11192-009-0146-3>
- Van Raan, A. F. J., & Tijssen, R. J. W. (1993). The neural net of neural network research. *Scientometrics*, 26(1), 169–192. <https://doi.org/10.1007/BF02016799>
- Walker, S., Heard, T., & Seamark, R. (1992). *Invitro Culture of Sheep Embryos Without*

Coculture—Successes and Perspectives. *Theriogenology*, 37(1), 111–126.  
[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90250-U](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90250-U)

Wu, G., Bazer, F. W., Satterfield, M. C., Li, X., Wang, X., Johnson, G. A., Burghardt, R. C., Dai, Z., Wang, J., & Wu, Z. (2013). Impacts of arginine nutrition on embryonic and fetal development in mammals. *Amino Acids*, 45(2), 241–256.  
<https://doi.org/10.1007/s00726-013-1515-z>

Xie, L., Chen, Z., Wang, H., Zheng, C., & Jiang, J. (2020). Bibliometric and Visualized Analysis of Scientific Publications on Atlantoaxial Spine Surgery Based on Web of Science and VOSviewer. *World Neurosurgery*, 137, 435-442.e4.  
<https://doi.org/10.1016/j.wneu.2020.01.171>

Xie, S. C., Low, B. G., Nagel, R. J., Kramer, K. K., Anthony, R. V., Zoli, A. P., Beckers, J. F., & Roberts, R. M. (1991). Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(22), 10247–10251.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.22.10247>

Zhang, J., Yu, Q., Zheng, F., Long, C., Lu, Z., & Duan, Z. (2016). Comparing keywords plus of WOS and author keywords: A case study of patient adherence research: Comparing Keywords Plus of WOS and Author Keywords. *Journal of the Association for Information Science and Technology*, 67(4), 967–972.  
<https://doi.org/10.1002/asi.23437>

## CAPITULO 2. IMPLICACIÓN DEL GEN INTERFERÓN TAU EN EL RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA GESTACIÓN EN LA OVEJA

### 2.1 RESUMEN

El objetivo de esta revisión fue describir las implicaciones del gen *interferón tau* en el reconocimiento materno de la gestación en la oveja. El presente artículo proporciona una descripción general de los últimos progresos en el conocimiento de las funciones del gen *interferón tau* en el reconocimiento materno de la gestación en la oveja. A partir de una búsqueda de artículos relacionados con el tema en las bases de datos Web of Science y SCOPUS. El gen *interferón tau* ( $IFN\tau$ ) participa en el reconocimiento materno de la gestación para prevenir un posible rechazo del embrión y apoya la secreción de progesterona que interviene en la preparación del endometrio para la implantación; además, inhibe la movilidad del miometrio para mantener la gestación. El  $IFN\tau$  estimula la transcripción de los llamados genes estimulados por el interferón (ISG) que son los efectores de la defensa antiviral autónoma en las células. Uno de los miembros de ISG representativos es el gen estimulado por el interferón 15 ( $ISG15$ ) que regula la receptividad endometrial en la implantación, así como la supervivencia, el crecimiento y el desarrollo del concepto. La mayoría de las pérdidas embrionarias ocurren entre la fertilización y el reconocimiento materno de la gestación. La comprensión de este tema es básica para entender las posibles causas de las pérdidas de gestaciones tempranas. Se ha obtenido un avance considerable en el descubrimiento de cómo actúan los genes *interferón tau* e  $ISG15$  en el reconocimiento materno de la gestación en la oveja. Sin

embargo, aún resta por comprenderse completamente los mecanismos de regulación involucrados.

**Palabras clave:** *IFN $\tau$* , *ISG15*, gestación.

## 2.2 ABSTRACT

The aim of this review was to describe the implications of the *interferon tau* gene in the maternal recognition of pregnancy in sheep. This article provides an overview of the latest advances in understanding the functions of the *interferon tau* gene in maternal recognition of pregnancy in sheep. From a search for articles related to the topic in the Web of Science and SCOPUS databases. *Interferon tau* (*IFN $\tau$* ) gene participates in the maternal recognition of pregnancy to prevent possible rejection of the embryo and supports the secretion of progesterone that intervenes in the preparation of the endometrium for implantation; In addition, it inhibits the mobility of the myometrium to maintain pregnancy. *IFN $\tau$*  stimulates the transcription of so-called interferon-stimulated genes (ISG) that are the effectors of autonomous antiviral defense in cells. One of the representative ISG members is the *interferon 15-stimulated gene* (*ISG15*) that regulates endometrial receptivity at implantation, as well as concept survival, growth, and development.

Most embryonic losses occur between fertilization and maternal recognition of pregnancy. Understanding this topic is essential to understand the possible causes of early pregnancy losses. Considerable progress has been made in the discovery how the *interferon tau* and *ISG15* genes act in maternal recognition of pregnancy in sheep. However, the regulatory mechanisms involved have yet to be fully understood.

**Keywords:** *IFN $\tau$* , *ISG15*, pregnancy.

## 2.3 INTRODUCCIÓN

Una gran parte de la pérdida de embriones se origina durante las primeras semanas post concepción. La mayoría de las pérdidas embrionarias ocurren entre la fertilización y el reconocimiento materno de la gestación (Lonergan *et al.*, 2016). Por lo tanto, es necesario atender esta problemática con la investigación de los enigmas de la implantación de embriones (Miller *et al.*, 2012). Se han utilizado los conocimientos moleculares que se encuentran en constante evolución para estudiar el proceso de reconocimiento materno de la gestación, junto con los aspectos moleculares de las interacciones endometrio-embrión, el desarrollo embrionario y la implantación (Zohni *et al.*, 2016). En rumiantes, el establecimiento de una comunicación adecuada entre el conceptus y el endometrio es fundamental para la implantación del embrión y posteriormente el proceso de placentación sea exitoso (Nakamura *et al.*, 2020). En este proceso participa la proteína conocida como interferón tau ( $IFN\tau$ ), llamada en un inicio proteína del trofoblasto o trofoblastina (Taverne y Noakes, 2019) la cual se produce por su gen homólogo que hoy día se conoce como *interferón tau* o conocido también como gen *TP-1* (Ealy y Wooldridge, 2017). Algunos estudios realizados con los genes *ISG15* e *IFN $\tau$*  *in vivo* como *in vitro* han confirmado su importancia en la función reproductiva en rumiantes.

El gen *IFN $\tau$*  participa en el reconocimiento materno de la gestación para prevenir un posible rechazo del embrión y además apoya la secreción de progesterona (D'Occhio *et al.*, 2020). Las moléculas de  $IFN\tau$  se unen a los receptores de la superficie celular e inician la transducción de señales, esto activa la transcripción de los llamados ISG que son los efectores de la defensa antiviral autónoma en las células. Uno de los miembros

de ISG representativos y bien estudiados con actividades antivirales específicas es el gen *ISG15* (Wang *et al.*, 2017). Dada la importancia decisiva del proceso de reconocimiento materno de la gestación, el objetivo de esta revisión fue describir las implicaciones del gen *interferón tau* en el reconocimiento materno de la gestación en la oveja.

## **2.4 Reconocimiento materno de la gestación e implantación**

El establecimiento exitoso de la gestación implica la ovulación de un ovocito, la fertilización por un espermatozoide y el crecimiento del embrión en un entorno propicio para el desarrollo normal (Lonergan y Sánchez, 2020). En varias especies domésticas, el cuerpo lúteo (CL) es importante en la regulación de la periodicidad del ciclo estral (Hennebold, 2018), debido a que el establecimiento de la gestación requiere que las concentraciones de progesterona permanezcan elevadas. Esto da como resultado una retroalimentación negativa en el hipotálamo y la hipófisis anterior con una inhibición del desarrollo folicular. En varias especies, la placenta posteriormente sustituye o complementa la fuente lútea de progesterona (Taverne y Noakes, 2019). La presencia de un embrión viable en desarrollo impide que el CL sea destruido (Pate, 2020) por acción de la prostaglandina  $F2\alpha$  y, por lo tanto, inhibe el retorno al estro. Este fenómeno fue definido en 1969 como el "reconocimiento materno de la gestación" (Short, 1969).

El embrión en desarrollo eventualmente llega a un proceso denominado alargamiento del conceptus, el cual es un fenómeno de corta duración que resulta de la remodelación y migración celular del embrión en desarrollo. El alargamiento del conceptus se inicia los días 12-13 en las ovejas y se asocia con la implantación y el reconocimiento de la gestación (Kasimanickam y Kasimanickam, 2020). Alrededor del día 12, las células del

trofoectodermo del embrión comienzan a secretar  $IFN\tau$ , el factor de reconocimiento de la gestación que anula el mecanismo luteolítico uterino para asegurar el mantenimiento de un CL funcional (Lonergan y Sánchez, 2020). La implantación del embrión es una sucesión compleja de acontecimientos que implican la unión, adhesión e invasión del blastocisto en el endometrio (Liu y Li, 2019). La comprensión de este tema es básico para entender las posibles causas de las pérdidas de gestaciones tempranas (Taverne y Noakes, 2019).

## **2.5 Función de la progesterona (P4) en el reconocimiento materno de la gestación**

La progesterona (P4) es secretada por el CL y la placenta (Schumacher *et al.*, 2014), es necesaria para el establecimiento, mantenimiento y éxito de la gestación (Wilson y Mesiano, 2020). En la oveja tiene dos funciones importantes; controlar la liberación de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH; Bartlewski *et al.*, 2017) y mantener la gestación (Keller *et al.*, 2019), debido a que interviene en la preparación del endometrio para la implantación del embrión e inhibe la movilidad del miometrio para mantener la gestación (Mondal *et al.*, 2017).

La P4 junto con el interferón tau son elementales para el mantenimiento de la gestación (Reynolds *et al.*, 2014) y la P4 bloquea el efecto proliferativo de los estrógenos e induce la expresión de genes que admiten que el endometrio acepte la unión del embrión (Halasz y Szekeres-Bartho, 2013). Altas concentraciones de P4 en el reconocimiento materno de la gestación se han asociado con el alargamiento del conceptus y un incremento en la producción de interferón tau, lo que trae como consecuencia tasas de gestación altas (Lonergan y Forde, 2014). Bajas concentraciones de P4 se relacionan con una menor fertilidad, reducción en el crecimiento y elongación del conceptus,

disminución de la producción de  $IFN\tau$  y menores tasas de gestación (Lonergan y Sánchez, 2020).

## 2.6 Interferones

Los interferones (IFN) son citocinas de amplia expresión con propiedades antivirales (González-Navajas *et al.*, 2012). Los IFN de mamíferos se clasifican en Tipo I, Tipo II y Tipo III (Bayer *et al.*, 2016). Los IFN de tipo I son un grupo de proteínas altamente relacionadas que incluyen los interferones alfa ( $IFN\alpha$ ), beta ( $IFN\beta$ ), delta ( $IFN\delta$ ), épsilon ( $IFN\epsilon$ ), tau ( $IFN\tau$ ) y omega ( $IFN\omega$ ) (Dembic, 2015). Los IFN de tipo II están representados por un solo miembro, denominado IFN gamma ( $IFN\gamma$ ), y la clase de IFN de tipo III contiene tres miembros que se conocen como IFN lambda ( $IFN\lambda 1$ , también conocido como IL-29),  $IFN\lambda 2$  (también conocido como IL-28A) e  $IFN\lambda 3$  (también conocido como IL-28B) (González-Navajas *et al.*, 2012). Los IFN son elementos del sistema inmunológico y sirven como respuesta a patógenos, tienen un rol clave en la reducción de la replicación de patógenos y en la regulación de las respuestas inmunes (Snell *et al.*, 2017).

### 2.6.1 Interferón tau ( $IFN\tau$ ) y su participación en el reconocimiento de la gestación

Moor (1968) realizó investigaciones en ovejas en las cuales demostró que el conceptus produce una proteína. Esta proteína ahora se conoce como interferón tau y es producida por su gen homólogo  $IFN\tau$  o conocido también como *TP-1*. El gen  $IFN\tau$  interactúa con las células uterinas para dirigir el establecimiento y mantenimiento de la gestación (Ealy y Wooldridge, 2017). Después de 1979, la purificación del  $IFN\tau$  reveló su actividad antiluteolítica para prevenir la regresión del CL en ovejas (Bazer y Thatcher, 2017).

Originalmente, se llamó proteína del trofoblasto ovino (*oTP-1*) o trofoblastina. Se ha demostrado que esta sustancia es un interferón de tipo I, clasificado como interferón tau ovino (*oIFN $\tau$* ); (Taverne y Noakes, 2019). El *IFN $\tau$*  es producido transitoriamente por el trofoectodermo ovino, siendo la expresión mayor en el epitelio uterino entre los días 13 y 14 del ciclo estral en las ovejas (Bazer y Thatcher, 2017). La secreción de *IFN $\tau$*  ovino por el trofoectodermo inicia el día 10 y aumenta a concentraciones máximas entre los días 13 y 16; luego deja de secretarse después del día 21 de gestación (Fuller *et al.*, 2019). El efecto principal del *IFN $\tau$*  en el reconocimiento materno de la gestación es alterar la dinámica de la secreción de PGF2 $\alpha$  en la etapa temprana (Taverne y Noakes, 2019). El *IFN $\tau$*  silencia la transcripción de los receptores a estradiol tipo 1 (RE1) y, por tanto, la expresión de los receptores de oxitocina (ROX) que dependen de los receptores RE1 en las células del lumen epitelial y epiteliales glandulares superficiales del útero para prevenir el proceso del mecanismo luteolítico endometrial que requiere liberación pulsátil de prostaglandinas inducidas por oxitocina (Fleming *et al.*, 2006). Actualmente se sabe que el *IFN $\tau$*  sirve como mediador vital de la señalización temprana entre el embrión en desarrollo y el endometrio uterino en rumiantes (Bazer *et al.*, 2018). La progesterona y el *IFN $\tau$*  operan de manera mutua para inducir la expresión de genes críticos para el desarrollo y la implantación del conceptus y en células epiteliales glandulares uterinas y del estroma para inducir la expresión de genes estimulados por el interferón (ISG) como: Proteína de resistencia al mixovirus inducida por interferón (*Mx1* y *Mx2*); Gen estimulado por interferón 15 (*ISG15*); 2'-5'-oligoadenilato sintetasa 1 (*OAS1*); Dominio radical que contiene S-adenosil metionina 2 (*RSAD2*); Transductor de señal y activador de la

transcripción 1 (*STAT1*) y 2 (*STAT2*); Factor regulador de interferón 1 (*IRF1*) y 9 (*IRF9*; Bazer y Thatcher, 2017). En la Figura 5 se aprecia el mecanismo de acción del *IFN $\tau$* .

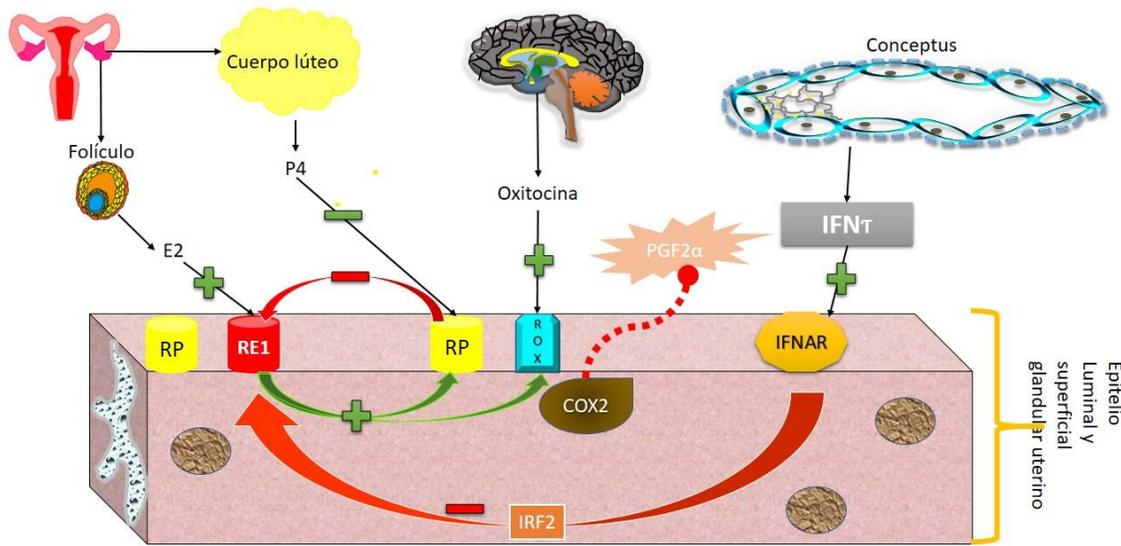


Figura 5. Mecanismo de acción del *IFN $\tau$* . RP: receptor de progesterona; RE1: receptor de estradiol tipo 1; ROX: receptor de oxitocina; IFNAR: receptor alfa de interferón; *PGF2 $\alpha$* : prostaglandina F2 alfa; E2: estradiol; P4: progesterona; COX2: prostaglandina-endoperóxido sintasa 2; IRF2: factor regulador de interferón.

Además de los efectos paracrinos del *IFN $\tau$*  secretado por el trofotodermo, se ha encontrado que los ISG se expresan en los componentes celulares del CL (Bazer y Thatcher, 2017). La acción endocrina de *IFN $\tau$*  repercute en el CL para inducir en sus células resistencia a prostaglandinas *F2 $\alpha$*  (Antoniazzi *et al.*, 2013). Conjuntamente mejora la expresión de *ISG15* en células lúteas (Oliveira *et al.*, 2008) y altera funciones de células inmunes dentro del CL para mantener su función y la gestación (Shirasuna *et al.*, 2015).

## 2.7 Genes estimulados por el interferón (ISG) durante el reconocimiento materno de la gestación

El  $IFN\tau$  también estimula los ISG en el epitelio glandular y las células del estroma endometrial. Asimismo, en tejidos periféricos como el CL y el hígado (Antoniazzi *et al.*, 2013). Se ha planteado la hipótesis de que muchos ISG desempeñan funciones en la implantación, la placentación y el desarrollo del conceptus (Won, 2008). A continuación, en la Figura 6 se muestran algunos de los ISG que se expresan en el endometrio ovino: *MX1*, *MX2*, *ISG15*, *OAS1* y *RSAD2*, *STAT1*, *STAT2* e *IRF*.

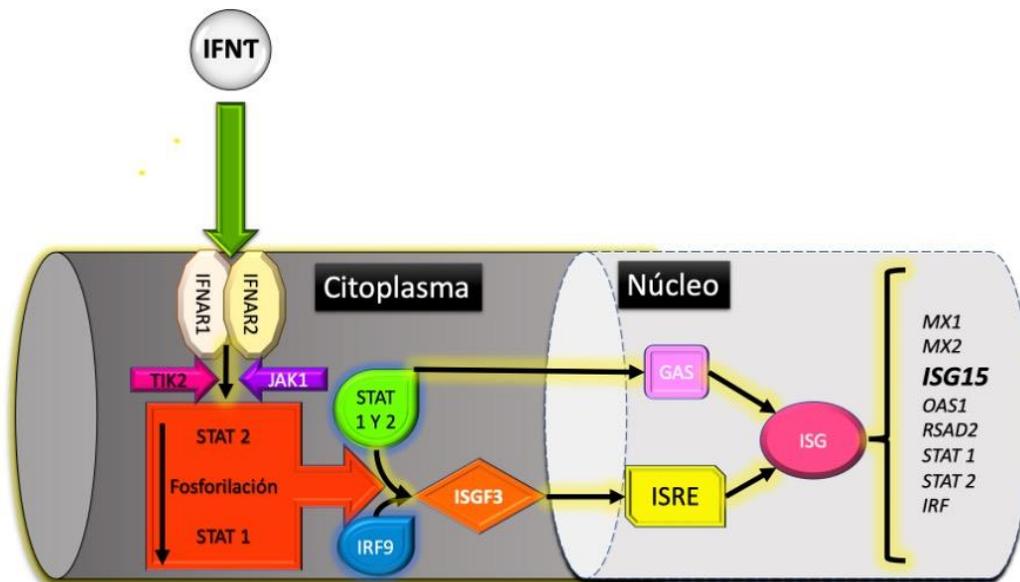


Figura 6. Vías de señalización del interferón tau en el epitelio endometrial ovino.  $IFN\tau$ : Interferón tau; IFNAR: receptor alfa de interferón; STAT: transductor de señal y activador de la transcripción; IRF9: factor regulador de interferón 9; ISGF3: factor del gen estimulado por interferón 3; ISG: genes estimulados por interferón; Mx: gen de resistencia al mixovirus; OAS: 2'-5'-oligoadenilato sintetasa; RSAD2:

Dominio radical S-adenosil metionina 2; ISG15: gen estimulado por el interferón 15.

### **2.7.1 El gen estimulado por el interferón 15 (*ISG15*)**

El *ISG15* se expresa en el útero de rumiantes en respuesta al  $IFN\tau$  (Joyce *et al.*, 2005). El *ISG15* se identificó por primera vez en células tumorales de ratón en las que la expresión estaba regulada por  $IFN$  de tipo I (Farrell *et al.*, 1979). Posteriormente, Blomstrom *et al.* (1986) purificaron y caracterizaron la proteína de 15kDa. El polipéptido fue llamado *ISG15* (Joyce *et al.*, 2005). Austin *et al.*, (2003). fueron los primeros en relacionarlo con el inicio del proceso de gestación al identificar la proteína *ISG15* secretada por el endometrio. El *ISG15* es una respuesta uterina crítica para los procesos progresivos de la implantación y la placentación, fue el primer modificador tipo ubiquitina (UBL, por sus siglas en inglés) descubierto y es estimulado con interferones de tipo I e infecciones de virus (Won, 2008). Este gen *ISG15* se sintetiza en muchos tipos de células y se secreta a partir de monocitos y linfocitos (Abidi y Xirodimas, 2015) e induce la síntesis y secreción de  $IFN\gamma$  a partir de las células B de los linfocitos, lo que implica que el papel del *ISG15* es como una citoquina que modula la respuesta inmune (Kurz *et al.*, 2005). Aunque las actividades biológicas de *ISG15* aún no se han dilucidado del todo, esta claro que el gen *ISG15* modula diversas funciones celulares y fisiológicas.

### **2.8 Efecto del gen *ISG15* en el desarrollo embrionario en ovejas**

La inducción de *ISG15* en respuesta al  $IFN\tau$  (Dzimianski *et al.*, 2019) está mediado por un sistema de transducción de señales intracelular que involucra a los receptores de  $IFN$  de tipo I, *STAT1*, *STAT2* e *IRF* (Morales y Lenschow, 2013). Se presume que *ISG15*

regula la receptividad endometrial en la implantación, la supervivencia, el crecimiento y el desarrollo del conceptus (embrión y las membranas extraembrionarias asociadas; Johnson *et al.*, 1999). Hay un aumento significativo en la expresión del gen *ISG15* en el útero ovino a los 15 días de gestación (Guo *et al.*, 2020). Se ha encontrado expresión de este gen en partes del estroma a lo largo de la interfaz útero-placentaria en la gestación. Además, los resultados de algunos estudios demuestran que los niveles de proteínas conjugadas con *ISG15* aumentan y luego disminuyen durante la gestación (Alak *et al.*, 2020), lo que indica que es una molécula biológicamente activa que responde a la señal de *IFN $\tau$*  del conceptus y que ataca temporalmente las proteínas para la regulación y modificación asociadas al proceso de gestación (Jain *et al.*, 2012). El *ISG15* endometrial no es simplemente una consecuencia de un estado antiviral inducido por altos niveles de *IFN $\tau$*  en el lumen de los rumiantes en el reconocimiento de la gestación, sino que es una respuesta uterina a los procesos del conceptus; desarrollo, implantación y placentación (Joyce *et al.*, 2005).

## 2.9 CONCLUSIONES

El gen *IFN $\tau$*  actúa vía paracrina en el endometrio y endocrina en el CL para ejercer sus efectos antiluteolíticos; esto desencadena que la producción de progesterona se mantenga y se produzca el reconocimiento materno de la gestación. Altas concentraciones de P4 en el reconocimiento materno de la gestación se han asociado con el alargamiento del conceptus y un incremento en la producción de *IFN $\tau$*  y mayores tasas de gestación. El *IFN $\tau$*  induce una regulación positiva de varios genes ISG entre los que se encuentra el gen *ISG15*, el cual está involucrado en la inmunorregulación materna

y otras funciones en la gestación temprana en la oveja, como la regulación de la receptividad endometrial durante la implantación.

## 2.10 LITERATURA CITADA

- Abidi, N., & Xirodimas, D. P. (2015). Regulation of cancer-related pathways by protein NEDDylation and strategies for the use of NEDD8 inhibitors in the clinic. *Endocrine-Related Cancer*, 22(1), T55-70. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0315>
- Alak, I., Hitit, M., Kose, M., Kaya, M. S., Ucar, E. H., Atli, Z., & Atli, M. O. (2020). Relative abundance and localization of interferon-stimulated gene 15 mRNA transcript in intra- and extra-uterine tissues during the early stages of pregnancy in sheep. *Animal Reproduction Science*, 216, 106347. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106347>
- Antoniuzzi, A. Q., Webb, B. T., Romero, J. J., Ashley, R. L., Smirnova, N. P., Henkes, L. E., Bott, R. C., Oliveira, J. F., Niswender, G. D., Bazer, F. W., & Hansen, T. R. (2013). Endocrine Delivery of Interferon Tau Protects the Corpus Luteum from Prostaglandin F2 Alpha-Induced Luteolysis in Ewes. *Biology of Reproduction*, 88(6), 144–144. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.105684>
- Austin, K. J., Bany, B. M., Belden, E. L., Rempel, L. A., Cross, J. C., & Hansen, T. R. (2003). Interferon-stimulated gene-15 (Isg15) expression is up-regulated in the mouse uterus in response to the implanting conceptus. *Endocrinology*, 144(7), 3107–3113. <https://doi.org/10.1210/en.2002-0031>
- Bartlewski, P. M., Sohal, J., Paravinja, V., Baby, T., Oliveira, M. E. F., Murawski, M., Schwarz, T., Zieba, D. A., & Keisler, D. H. (2017). Is progesterone the key regulatory factor behind ovulation rate in sheep? *Domestic Animal Endocrinology*, 58, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.06.006>
- Bayer, A., Lennemann, N. J., Ouyang, Y., Bramley, J. C., Morosky, S., Marques, E. T. D. A., Cherry, S., Sadovsky, Y., & Coyne, C. B. (2016). Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. *Cell Host & Microbe*, 19(5), 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.008>
- Bazer, F. W., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Spencer, T. E., & Wu, G. (2018). Mechanisms for the establishment and maintenance of pregnancy: Synergies from scientific collaborations†. *Biology of Reproduction*, 99(1), 225–241. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y047>
- Bazer, F. W., & Thatcher, W. W. (2017). Chronicling the discovery of interferon tau. *Reproduction*, 154(5), F11–F20. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0257>
- Blomstrom, D. C., Fahey, D., Kutny, R., Korant, B. D., & Knight, E. (1986). Molecular characterization of the interferon-induced 15-kDa protein. Molecular cloning and

- nucleotide and amino acid sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 261(19), 8811–8816. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84453-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84453-8)
- Dembic, Z. (2015). Cytokines of the Immune System. En *The Cytokines of the Immune System* (pp. 123–142). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-419998-9.00005-5>
- D'Occhio, M. J., Campanile, G., & Baruselli, P. S. (2020). Transforming growth factor- $\beta$  superfamily and interferon- $\tau$  in ovarian function and embryo development in female cattle: Review of biology and application. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(6), 539. <https://doi.org/10.1071/RD19123>
- Dzimianski, J. V., Scholte, F. E. M., Bergeron, É., & Pegan, S. D. (2019). ISG15: It's Complicated. *Journal of Molecular Biology*, 431(21), 4203–4216. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.013>
- Ealy, A. D., & Wooldridge, L. K. (2017). The evolution of interferon-tau. *Reproduction*, 154(5), F1–F10. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0292>
- Farrell, P. J., Broeze, R. J., & Lengyel, P. (1979). Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells. *Nature*, 279(5713), 523–525. <https://doi.org/10.1038/279523a0>
- Fleming, J. G. W., Spencer, T. E., Safe, S. H., & Bazer, F. W. (2006). Estrogen Regulates Transcription of the Ovine Oxytocin Receptor Gene through GC-Rich SP1 Promoter Elements. *Endocrinology*, 147(2), 899–911. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1120>
- Fuller, W. B., Jinyoung, K. J., Gwonhwa, S. G., Hakhyun, K. H., Guoyao, W. G., Johnson, G. A., & Vallet, J. L. (2019). Roles of selected nutrients in development of the porcine conceptus during pregnancy. *Bioscientifica Proceedings*. <https://doi.org/10.1530/biosciproc.19.0016>
- González-Navajas, J. M., Lee, J., David, M., & Raz, E. (2012). Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature Reviews Immunology*, 12(2), 125–135. <https://doi.org/10.1038/nri3133>
- Guo, Y., Song, Z., Cheng, X., Wang, Y., Luo, X., An, R., Wang, J., & Gao, M. (2020). Molecular and functional characterization of ovis aries IFN-epsilon. *Molecular Immunology*, 119, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.01.001>
- Halasz, M., & Szekeres-Bartho, J. (2013). The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *Journal of Reproductive Immunology*, 97(1), 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.10.011>
- Hennebold, J. D. (2018). Corpus Luteum. En *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 99–105). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64396-9>
- Jain, A., Baviskar, P. S., Kandasamy, S., Kumar, R., Singh, R., Kumar, S., Agarwal, S. K., Joshi, P., & Mitra, A. (2012). Interferon stimulated gene 15 (ISG15): Molecular

- characterization and expression profile in endometrium of buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Reproduction Science*, 133(3–4), 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.06.023>
- Johnson, G. A., Spencer, T. E., Hansen, T. R., Austin, K. J., Burghardt, R. C., & Bazer, F. W. (1999). Expression of the Interferon Tau Inducible Ubiquitin Cross-Reactive Protein in the Ovine Uterus. *Biology of Reproduction*, 61(1), 312–318. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.1.312>
- Joyce, M. M., White, F. J., Burghardt, R. C., Muñiz, J. J., Spencer, T. E., Bazer, F. W., & Johnson, G. A. (2005). Interferon Stimulated Gene 15 Conjugates to Endometrial Cytosolic Proteins and Is Expressed at the Uterine-Placental Interface throughout Pregnancy in Sheep. *Endocrinology*, 146(2), 675–684. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1224>
- Kasimanickam, R. K., & Kasimanickam, V. R. (2020). IFNT, ISGs, PPARs, RXRs and MUC1 in day 16 embryo and endometrium of repeat-breeder cows, with or without subclinical endometritis. *Theriogenology*, 158, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.09.001>
- Keller, M., Vandenberg, L. N., & Charlier, T. D. (2019). The parental brain and behavior: A target for endocrine disruption. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 54, 100765. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.100765>
- Kurz, T., Ozlü, N., Rudolf, F., O'Rourke, S. M., Luke, B., Hofmann, K., Hyman, A. A., Bowerman, B., & Peter, M. (2005). The conserved protein DCN-1/Dcn1p is required for cullin neddylation in *C. elegans* and *S. cerevisiae*. *Nature*, 435(7046), 1257–1261. <https://doi.org/10.1038/nature03662>
- Liu, F., & Li, R. (2019). The Role of Neuroendocrine in Embryo Implantation. En B. Wu & H. L. Feng (Eds.), *Embryology—Theory and Practice*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87863>
- Lonergan, P., & Forde, N. (2014). Maternal-embryo interaction leading up to the initiation of implantation of pregnancy in cattle. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 8 Suppl 1, 64–69. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000470>
- Lonergan, P., & Sánchez, J. M. (2020). Symposium review: Progesterone effects on early embryo development in cattle. *Journal of Dairy Science*, 103(9), 8698–8707. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18583>
- Lonergan, Pat, Forde, N., & Spencer, T. (2016). Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility, and Development*, 28(1–2), 66–74. <https://doi.org/10.1071/RD15326>
- Miller, P. B., Parnell, B. A., Bushnell, G., Tallman, N., Forstein, D. A., Higdon, H. L., Kitawaki, J., & Lessey, B. A. (2012). Endometrial receptivity defects during IVF cycles with and without letrozole. *Human Reproduction*, 27(3), 881–888. <https://doi.org/10.1093/humrep/der452>

- Mondal, S., Mor, A., & Reddy, I. J. (2017). Factors/Genes in Maternal Recognition of Pregnancy. En *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 597–630). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63660-7.00023-1>
- Moor, R. M. (1968). *J. Anim. Sci*, 27, 97.
- Morales, D. J., & Lenschow, D. J. (2013). The Antiviral Activities of ISG15. *Journal of Molecular Biology*, 425(24), 4995–5008. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.041>
- Nakamura, K., Kusama, K., Suda, Y., Fujiwara, H., Hori, M., & Imakawa, K. (2020). Emerging Role of Extracellular Vesicles in Embryo–Maternal Communication throughout Implantation Processes. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5523. <https://doi.org/10.3390/ijms21155523>
- Oliveira, J. F., Henkes, L. E., Ashley, R. L., Purcell, S. H., Smirnova, N. P., Veeramachaneni, D. N. R., Anthony, R. V., & Hansen, T. R. (2008). Expression of Interferon (IFN)-Stimulated Genes in Extrauterine Tissues during Early Pregnancy in Sheep Is the Consequence of Endocrine IFN- $\tau$  Release from the Uterine Vein. *Endocrinology*, 149(3), 1252–1259. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0863>
- Pate, J. L. (2020). Roadmap to pregnancy during the period of maternal recognition in the cow: Changes within the corpus luteum associated with luteal rescue. *Theriogenology*, 150, 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.074>
- Reynolds, L. P., Borowicz, P. P., Palmieri, C., & Grazul-Bilska, A. T. (2014). Placental Vascular Defects in Compromised Pregnancies: Effects of Assisted Reproductive Technologies and Other Maternal Stressors. En L. Zhang & C. A. Ducsay (Eds.), *Advances in Fetal and Neonatal Physiology* (Vol. 814, pp. 193–204). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1031-1\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1031-1_17)
- Schumacher, M., Mattern, C., Ghoumari, A., Oudinet, J. P., Liere, P., Labombarda, F., Sitruk-Ware, R., De Nicola, A. F., & Guennoun, R. (2014). Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: Resurgence of the progesterone receptors. *Progress in Neurobiology*, 113, 6–39. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.09.004>
- Shirasuna, K., Matsumoto, H., Matsuyama, S., Kimura, K., Bollwein, H., & Miyamoto, A. (2015). Possible role of interferon tau on the bovine corpus luteum and neutrophils during the early pregnancy. *REPRODUCTION*, 150(3), 217–225. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0085>
- Short, R. V. (1969). Implantation and the Maternal Recognition of Pregnancy. En G. E. W. Wolstenholme & M. O'Connor (Eds.), *Novartis Foundation Symposia* (pp. 2–31). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470719688.ch2>
- Snell, L. M., McGaha, T. L., & Brooks, D. G. (2017). Type I Interferon in Chronic Virus Infection and Cancer. *Trends in Immunology*, 38(8), 542–557. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.05.005>

- Taverne, M., & Noakes, D. E. (2019). Pregnancy and Its Diagnosis. En *Veterinary Reproduction and Obstetrics* (pp. 78–114). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-7233-8.00005-7>
- Wang, W., Xu, L., Su, J., Peppelenbosch, M. P., & Pan, Q. (2017). Transcriptional Regulation of Antiviral Interferon-Stimulated Genes. *Trends in Microbiology*, *25*(7), 573–584. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.01.001>
- Wilson, R. A., & Mesiano, S. A. (2020). Progesterone signaling in myometrial cells: Role in human pregnancy and parturition. *Current Opinion in Physiology*, *13*, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.09.007>
- Won A. H. (2008). *Progesterone and interferon tau regulated genes in the endometrium of the ovine uterus and expression of interferon stimulated genes in the corpus luteum during early pregnancy in sheep*. Texas A&M University College Station.
- Zohni, K. M., Gat, I., & Librach, C. (2016). Recurrent implantation failure: A comprehensive review. *Minerva Ginecologica*, *68*(6), 653–667.

# CAPITULO 3. INFLUENCIA DE eCG Y PROGESTERONA EN VARIABLES REPRODUCTIVAS E IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN TP-1 EN OVEJAS DE PELO

## 3.1 RESUMEN

Se han utilizado diferentes protocolos de sincronización del estro con la finalidad de asegurar la gestación en ovejas. Sin embargo, en los pequeños rumiantes, la eficiencia reproductiva se ve afectada por la mortalidad de los embriones, en el periodo de implantación embrionaria, lo cual limita la producción de la oveja y la productividad del rebaño. Los objetivos de este estudio fueron: 1) evaluar el efecto de la adición de gonadotropina coriónica equina (eCG) y el aporte exógeno de progesterona post-monta en variables reproductivas, medición de niveles plasmáticos de estradiol y progesterona y 2) identificar polimorfismos de nucleótido simple en el gen *TP-1* en ovejas de pelo sincronizadas en época reproductiva. Se utilizaron 40 ovejas de pelo que fueron distribuidas aleatoriamente en cuatro tratamientos diferentes. A todas las ovejas se les realizó una presincronización con dos dosis de prostaglandina F2 alfa, con un intervalo de 11 días. Luego se realizó la sincronización del estro. En las variables: manifestación del estro, retorno a estro, gestación, parición no se encontraron diferencias ( $p>0.05$ ). Se encontraron diferencias ( $p<0.05$ ) en las variables inicio al estro, prolificidad y fecundidad, niveles de estradiol y progesterona. Se identificaron cuatro polimorfismos en el gen *TP-1*. Dos de las mutaciones encontradas son transversiones y dos son transiciones. La eCG redujo el tiempo al inicio de estro y el aporte exógeno de progesterona post-monta incrementó la fecundidad y favoreció la prolificidad en ovejas de pelo.

**Palabras clave:** Oveja, progesterona, estradiol, eCG, polimorfismo, *TP-1* y gen

### 3.2 SUMMARY

Different protocols for oestrus synchronization have been used in order to ensure pregnancy in ewes. However, in small ruminants, reproductive efficiency is affected by embryo mortality in the embryo implantation period, which limits sheep production and herd productivity. The aims of this study were: 1) to evaluate the effect of the addition of equine chorionic gonadotropin (eCG) and the exogenous contribution of post-mount progesterone on reproductive variables, measurement of plasma levels of estradiol and progesterone and 2) identify nucleotide polymorphisms simple in the TP-1 gene in synchronized hair ewes in reproductive season. 40 hair sheep were used that were randomly distributed in four different treatments. All sheep were presynchronized with two doses of prostaglandin F2 alpha, with an interval of 11 days. Then the estrus synchronization was performed. In the variables: manifestation of oestrus, return to oestrus, gestation, parturition, no differences were found ( $p > 0.05$ ). Differences were found ( $p < 0.05$ ) in the variables onset to estrus, prolificacy and fertility, estradiol and progesterone levels. Four polymorphisms were identified in the TP-1 gene. Two of the mutations found are transversions and two are transitions. ECG reduced the time to the onset of estrus and the exogenous supply of post-mating progesterone increased fertility and favored prolificacy in hair ewes.

**Key words:** Sheep, progesterone, estradiol, eCG, polymorphism, TP-1 and gene

### 3.3 INTRODUCCIÓN

El crecimiento poblacional dentro de cuatro décadas provocará una pérdida generalizada de la seguridad alimentaria en todo el mundo. Esto debe afrontarse con el incremento en la producción ganadera; en la cual la eficiencia reproductiva es una de las bases en la producción ganadera y es fundamental que se realicen avances tecnológicos para aumentar el suministro de alimentos de origen animal (Bizzarri *et al.*, 2011). La investigación básica en la cría de ovinos ha aportado durante las últimas cinco décadas el sustento para desarrollar tecnologías de reproducción asistida, las cuales han incrementado la eficiencia reproductiva en los rebaños, aunque la eficiencia de las técnicas no ha sido suficiente (Naitana y Ledda, 2020).

Una de las formas de manejo reproductivo más evolucionadas es la sincronización del estro. A través de la manipulación del ciclo estral se provoca que una gran cantidad de hembras manifiesten estro en un lapso corto (Pal y Rayees Dar, 2021). Se han utilizado diferentes protocolos de sincronización del estro con la finalidad de asegurar la gestación en ovejas (Martinez-Ros *et al.*, 2018). Sin embargo, en los pequeños rumiantes, la eficiencia reproductiva se ve afectada por la mortalidad de los embriones, en el periodo de implantación embrionaria, lo cual limita la producción de la oveja y la productividad del rebaño. En la oveja, la mortalidad embrionaria temprana se debe al descenso en las concentraciones de progesterona (Maidin *et al.*, 2014). La secreción insuficiente de progesterona al principio del primer trimestre se asocia con la pérdida de la gestación y se atribuye a la pérdida anticipada de la función lútea (Bech-Sàbat *et al.*, 2010). Hace treinta años, se identificó un nuevo interferón de tipo 1, llamado en un inicio proteína del trofoblasto o trofoblastina (Taverne y Noakes, 2019), la cual se produce por su gen

homólogo que hoy día se conoce como *interferón tau* ( $IFN\tau$ ) o también conocido como gen *TP-1*. El gen del  $IFN\tau$  interactúa con las células uterinas para dirigir el establecimiento y mantenimiento de la gestación (Ealy y Wooldridge, 2017). En los últimos años se ha realizado investigación relacionada con el  $IFN\tau$  (Ealy y Wooldridge, 2017; Kim *et al.*, 2018; Kasimanickam y Kasimanickam, 2020) encaminada a mejorar la eficiencia reproductiva. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la adición de gonadotropina coriónica equina (eCG) y el aporte exógeno de progesterona post-monta en variables reproductivas, medición de niveles plasmáticos de estradiol y progesterona e identificación de polimorfismos de nucleótido simple en el gen *TP-1* en ovejas de pelo sincronizadas en época reproductiva.

### **3.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.4.1 Localización**

El estudio se realizó en la granja experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en la Calle del Río número 107, San Diego, 56200, Texcoco de Mora, México. La localización geográfica es N 19° 29' 45.092", O 98° 52' 8.461" y a una altitud de 2257 m. El clima es templado semiseco, con una temperatura media anual de 15.9°C, con heladas poco frecuentes y una precipitación pluvial media anual de 686.0 mm (García, 2004).

#### **3.4.2 Animales**

Se utilizaron 40 ovejas de pelo de  $3.2 \pm 0.22$  años y un peso de  $53.6 \pm 1.98$  Kg con historial reproductivo. Durante el experimento, las ovejas se mantuvieron en corrales

provistos con tejado, piso seco, comederos y bebederos. Se proporcionó una dieta a base de ensilado de maíz ( $4.5 \text{ Kg oveja}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) con  $2.49 \text{ Mcal Kg}^{-1}$  de EM. Se suplementó con  $350 \text{ g oveja}^{-1}$  de alimento concentrado. Antes de iniciar el experimento, a todas las ovejas se les aplicó un antiparasitario vitaminado (PARMISOLE 12% ADE+B®) vía intramuscular, de acuerdo a la recomendación del laboratorio (PARFARM, México) para la especie ( $1 \text{ mL}$  por cada  $20 \text{ kg}$  de peso corporal). Los machos se mantuvieron en corrales separados con las mismas condiciones de alojamiento que las ovejas y se les dio el mismo manejo general que a las hembras antes de iniciar el experimento.

### 3.4.3 Tratamientos

Las 40 ovejas fueron distribuidas aleatoriamente en cada uno de los cuatro tratamientos: T1 ( $n=10$ ), dispositivo vaginal con progesterona (CIDR®) y prostaglandina F2 alfa ( $\text{PGF2}\alpha$ ); T2 ( $n=10$ ), CIDR®,  $\text{PGF2}\alpha$  más una dosis de eCG ( $300 \text{ UI}$ ) al séptimo día del protocolo de sincronización; T3 ( $n=10$ ), CIDR®,  $\text{PGF2}\alpha$ , eCG ( $300 \text{ UI}$ ) e inserción de un dispositivo CIDR® desde el día 7 después del retiro del CIDR® hasta el día 17 post estro inducido; T4 ( $n=10$ ), CIDR®,  $\text{PGF2}\alpha$ , eCG ( $300 \text{ UI}$ ) e inserción de un dispositivo CIDR® desde el día 7 después del retiro del CIDR® hasta el día 34 post estro inducido (Figura 7).

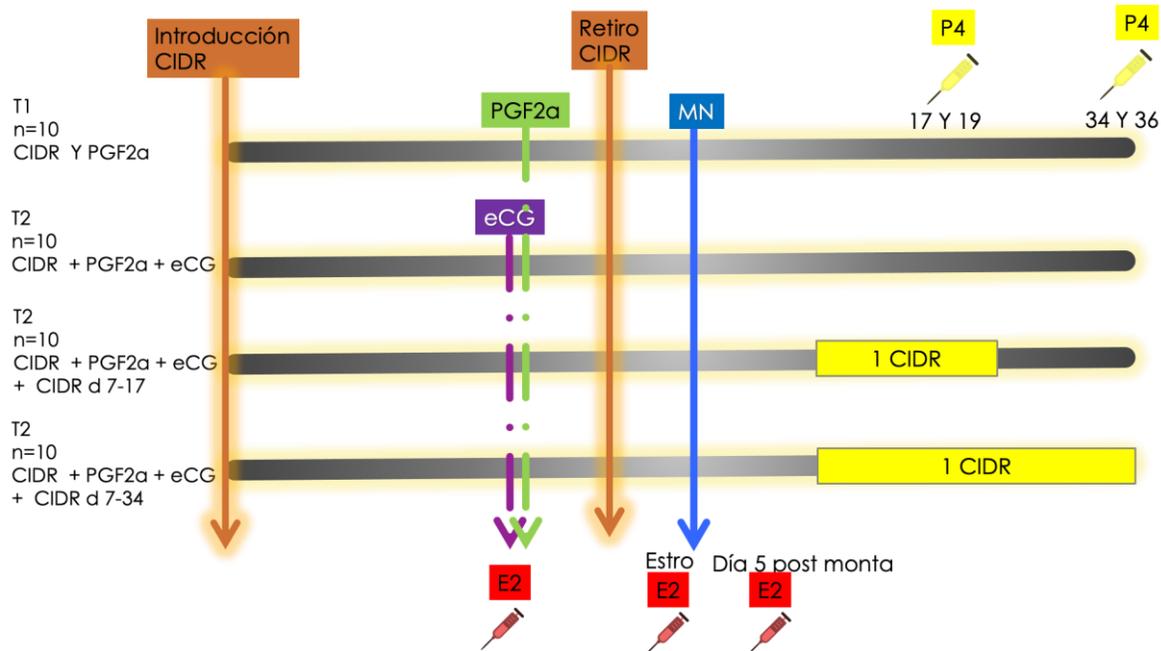


Figura 7. Distribución de los tratamientos de sincronización de estrógeno utilizados en ovejas de pelo.

### 3.4.4 Presincronización y sincronización del estrógeno

A todas las ovejas se les realizó una presincronización con dos dosis de prostaglandina F2 alfa (PGF2α; 5 mg de Dinoprost trometamina, Lutalyse®, USA), con un intervalo de 11 días, a los -18 y -7 días. Luego se realizó la sincronización del estrógeno (día cero) mediante dispositivos vaginales (CIDR®, con 0.3 g de progesterona, Zoetis, Hamilton, Nueva Zelanda) que permanecieron por nueve días en las ovejas. Y al séptimo día, se les aplicó una dosis de PGF2α (5 mg de Dinoprost trometamina, Lutalyse®, Zoetis, USA). En el caso de las ovejas de los tratamientos T2, T3 y T4 se les aplicó una dosis de 300 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG, Folligon® Intervet, Boxmeer, Holanda) y en los tratamientos T3 y T4, se les insertó un CIDR® vaginal desde el día 7 post inseminación y permaneció hasta el día 17 y 34, respectivamente.

#### 3.4.5 Detección de estros, monta natural y retornos a estro

La detección de los estros se realizó en intervalos regulares de 4h, a partir de la extracción de los dispositivos CIDR® y durante un periodo de 72 h. A las ovejas detectadas en estro se les dio monta natural, al momento de la detección y 12 h después, con carneros aptos reproductivamente y evaluados previamente para calidad seminal. Se realizó la medición de los retornos a estro, los días 15 al 19 en los tratamientos T1, T2 y T3 y, los días 32 al 36 en los cuatro tratamientos. Se introdujeron sementales celadores equipados con un mandil a los corrales, para evitar la copula de las ovejas, durante 60 min por la mañana y 60 min por la tarde.

#### 3.4.6 Diagnóstico de gestación, prolificidad y fecundidad

Se realizó el diagnóstico de gestación mediante ecografía el día 40 después de la monta, para esto se utilizó un equipo Universal medical systems 900 Inc. El número de ovejas gestantes se registró y se confirmó al momento del parto. Para determinar estas dos variables se atendieron los partos con la finalidad de contar y registrar el número de corderos nacidos por cada oveja parida (prolificidad) y por el total de ovejas en el tratamiento (fecundidad).

#### 3.4.7 Análisis de estradiol y progesterona

Se recolectaron muestras de sangre de las ovejas directamente de la vena yugular en tubos Vacutainer® (BD, NJ, USA). Las muestras de sangre para determinar los niveles plasmáticos de estradiol se recolectaron al día siete del protocolo de sincronización del estro, al momento de la manifestación de estro y al día cinco post monta en cada oveja.

Y las muestras de sangre para medir los niveles plasmáticos de progesterona se recolectaron los días 17, 19, 34 y 36 posteriores a la manifestación de estro en cada oveja. Se separó el suero por centrifugación a una fuerza centrífuga relativa (RCF) 706 x *g* por 20 min, se trasladó a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se almacenó a -20° C hasta el momento de su análisis. Las concentraciones séricas de estradiol (pg mL<sup>-1</sup>) se midieron con un kit de ELISA comercial (DRG® Instruments GmbH, Marburg, Germany) con un rango (10.6 – 2000 pg mL<sup>-1</sup>) y una sensibilidad (9.714 pg mL<sup>-1</sup>) y las concentraciones séricas de progesterona (ng mL<sup>-1</sup>) se midieron con un kit de ELISA comercial (DRG® Instruments GmbH, Marburg, Germany) con un rango (0 – 40 ng mL<sup>-1</sup>) y una sensibilidad (0.045 ng mL<sup>-1</sup>). Los procedimientos de inmunoensayo se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante y las lecturas de absorbancias se realizaron mediante un fotómetro automático (MRX Microplate Reader, Dynatech Laboratories®, EUA). Las muestras se analizaron en el laboratorio de Reproducción y Endocrinología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

#### 3.4.8 Análisis del gen TP-1

Se recolectaron muestras de sangre de las 40 ovejas de pelo directamente de la vena yugular y se depositaron en tarjetas Tecnología Asociada Flinders o por sus siglas en inglés FTA Whatman TM Elute Cards (GE Whatman, Maidstone, Kent, United Kingdom) directamente 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.*, 2020b). Las tarjetas se secaron 30 min para ser colocadas en sobres etiquetados individuales y se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente (Dash *et al.*, 2020a)

para su análisis posterior. En el laboratorio se purificó el ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir de las tarjetas Whatman FTA. Se realizó un corte de aproximadamente 0.5mm de diámetro y ese trozo de tarjeta se introdujo en un tubo Eppendorf de 0.2 mL. Luego se procedió con la fase de lavado que consistió en agregar 200  $\mu$ L de reactivo de purificación FTA reagent por 5 min. Una vez que pasaron los 5 min, el reactivo usado se desechó mediante decantación (esto se repitió tres veces). Después se le agregó al trozo de tarjeta 200 $\mu$ L de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0) a temperatura ambiente por 5 min. Una vez que pasaron los 5 min, el buffer usado se desechó mediante decantación (esto se repitió dos veces). El gen *TP-1* se amplificó mediante la PCR. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 12.5  $\mu$ L, con 6.25  $\mu$ L de mezcla maestra de reacción para PCR (Master Mix 2X, (Promega© Madison, WI, USA), 0.625  $\mu$ L para cada iniciador (10 mM) del gen *TP-1*; For-5'- GCTCCTGGACCGAATGAACA - 3'; Rev-5'- GGAGGCTGATGTGGCATCTT -3', número de acceso, NM\_001123399.1 (Brooks y Spencer, 2015) y 5  $\mu$ L de dihidrato de trehalosa Fluka® al 10 % (en agua libre de nucleasas y proteasas, Merck© KGaA 64271, Darmstadt, Alemania). Los tubos con el fragmento de la tarjeta procesada y la mezcla de reacción, ya homogenizada, se colocaron en un termociclador C1000 (Bio Rad, California, E.E.U.U). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Desnaturalización inicial, 95 °C, cinco min, luego 30 ciclos (desnaturalización 95 °C por 30 s, alineamiento 61 °C por 45 s y extensión 72 °C, 50 s) y extensión final 72 °C por cinco min. Los amplicones resultantes se separaron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% con un buffer de corrida TAE 1x Tris-Acetato-EDTA 1x (Merck© KGaA 64271, Darmstadt, Alemania) con un voltaje de 80 por 45 min; buffer de carga Loading Dye 6x y marcador molecular  $\Phi$ X174 DNA-Hae III (New

England BioLabs, MA, USA). El gel se tiñó con GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, SFO Bay Area, USA). Posteriormente, el gel se reveló en un fotodocumentador Equipar®. Esta fase se realizó en el laboratorio de biología molecular del Postgrado de Genética, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados.

#### 3.4.9 Secuenciación y análisis de secuencias

Para la limpieza y secuenciación de los amplicones obtenidos (10µL de cada uno), se enviaron a la empresa MACROGEN© (Seúl, Corea del Sur). Con las secuencias de buena calidad, se realizó una búsqueda de secuencias similares en el National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la función BLAST y se seleccionaron los números de las secuencias de referencia X56345.1 y X07920.1 por el porcentaje de similitud con las secuencias obtenidas. El análisis de la calidad de las secuencias de ADN fue realizado en el software Geneious Prime® versión 2019.0.4. Los alineamientos de las secuencias se realizaron en el programa ClustalW (Thompson, 1997), incluido en el software Mega 7 (Kumar *et al.*, 2016).

#### 3.4.10 Análisis estadístico

La variable manifestación de estros se analizó mediante el modelo de regresión logística, con el procedimiento Logistic. La variable inicio al estro se analizó con el método de curvas de sobrevivencia Log-Rank, mediante el procedimiento Life Test y la prueba de comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ). Las variables porcentaje de retorno al estro, porcentaje de gestación, porcentaje de parto, índice de prolificidad y de fecundidad fueron analizadas con una regresión binomial negativa, mediante el procedimiento (GENMOD) del paquete estadístico SAS y presentados en

medias  $\pm$  error estándar. Las diferencias fueron consideradas significativas con  $p < 0.05$ . Las concentraciones de estradiol y progesterona se analizaron con el procedimiento GLM y conjuntamente se utilizó la prueba de Tukey para comparar las medias de los tratamientos. Las covariables: peso y edad no fueron significativas ( $p > 0.05$ ) en cada uno de los modelos estadísticos usados, esto sugiere que no influyeron en la respuesta a los tratamientos utilizados. Se usó la prueba de neutralidad Tajima's D (Tajima, 1989) para probar la hipótesis de que todas las mutaciones observadas son selectivamente neutrales.

### 3.5 RESULTADOS

#### 3.5.1 Manifestación e inicio al estro

En la manifestación del estro en las ovejas de pelo, en las condiciones reportadas para este estudio, no se encontraron diferencias estadísticas entre los cuatro tratamientos ( $p > 0.05$ ). En las ovejas de los grupos T4 ( $29.2 \pm 6.02h$ ) y T2 ( $29.6 \pm 5.4$ ) el inicio del estro fue más rápido que las ovejas del grupo T1 ( $53.2 \pm 6.50$ ;  $p < 0.05$ ; Cuadro 6). En la Figura 8 se muestran las curvas de supervivencia para inicio del estro en las ovejas de pelo sincronizadas.

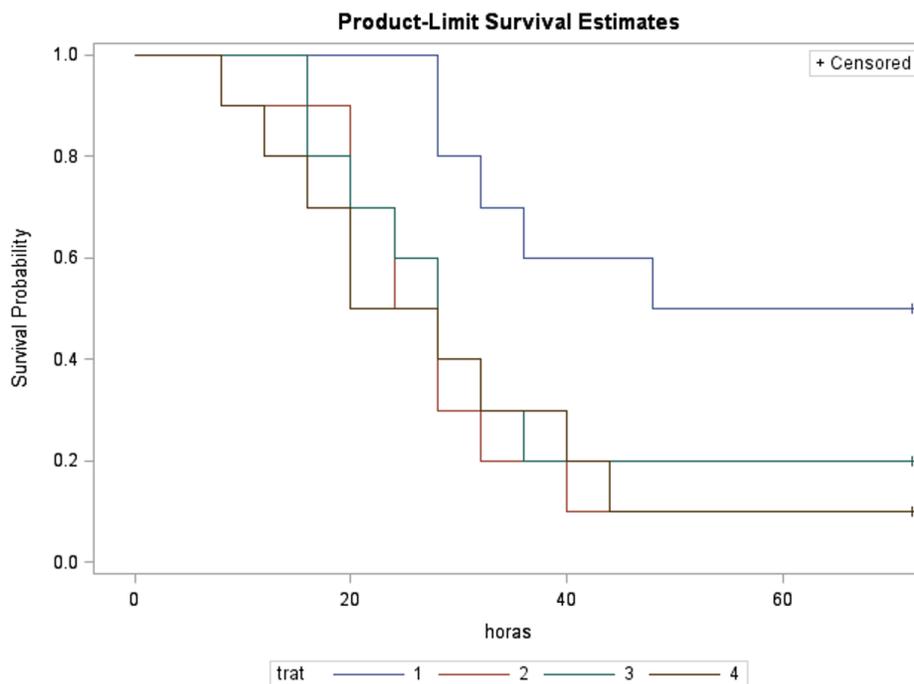


Figura 8. Curvas de supervivencia de inicio del estro, formadas por los estimadores de supervivencia de Kaplan-Meier a diferentes tiempos por tratamiento. T1: CIDR® + PGF2 $\alpha$ ; T2: CIDR® + PGF2 $\alpha$  + eCG; T3: CIDR® + PGF2 $\alpha$  + eCG + 1 CIDR® 7-17d; T4: CIDR® + PGF2 $\alpha$  + eCG + 1 CIDR® 7-34d. Long Rank ( $p=0.0319$ ).

### 3.5.2 Retorno a estro

No se encontraron diferencias en la tasa de retorno a estro al día 17 post monta ( $p>0.05$ ) entre los grupos T1, T2 y T3. Sin embargo, para el grupo T4 no se observó este dato debido a que estas ovejas tuvieron un CIDR® hasta el día 34 post monta. Al igual, en el día 34 post monta tampoco se encontraron diferencias ( $p>0.05$ ) entre los cuatro tratamientos (Cuadro 6).

### 3.5.3 Porcentaje de gestación y de parto

Para estas dos variables de estudio, no se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre los cuatro tratamientos (Cuadro 6).

### 3.5.4 Índice de prolificidad y de fecundidad

Se encontraron diferencias significativas en el índice de prolificidad de ovejas de pelo ( $p<0.05$ ; Cuadro 6). Las ovejas del grupo T3 (1.85) manifestaron mayor prolificidad que el grupo T1 (1.0;  $p<0.05$ ; Cuadro 6). El índice de fecundidad de las ovejas de los grupos T2, T3 y T4 (1.1, 1.3 y 1.4, respectivamente) fue diferente ( $p<0.05$ ) a la fecundidad de las ovejas de T1 (0.4; Cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados de las variables reproductivas evaluadas en ovejas de pelo sincronizadas en la época reproductiva.

Variables respuesta	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
Respuesta al estro (%)	50 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>
Inicio al estro (h)	53.2 ± 6.5 <sup>a</sup>	29.6 ± 5.4 <sup>b</sup>	34.4 ± 5.5 <sup>ab</sup>	29.2 ± 6.0 <sup>b</sup>
Tasa de retorno (% d17)	0 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	n/d <sup>a</sup>
Tasa de retorno (% d34)	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Porcentaje de gestación (%)	50 <sup>a</sup>	70 <sup>a</sup>	70 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>
Porcentaje de parto (%)	40 <sup>a</sup>	70 <sup>a</sup>	70 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>
Índice de prolificidad	1.0 <sup>b</sup>	1.57 ± 0.1 <sup>ab</sup>	1.85 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.1 <sup>ab</sup>
Índice de fecundidad	0.4 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.2 <sup>a</sup>

Literal diferente dentro de cada fila indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). T1: CIDR® + PGF2 $\alpha$ ; T2: CIDR® + PGF2 $\alpha$  + eCG; T3: CIDR® + PGF2 $\alpha$  + eCG + 1 CIDR® 7-17d; T4: CIDR® + PGF2 $\alpha$  + eCG + 1 CIDR® 7-34d, n/d: no hubo dato para esa variable, porque las ovejas de T4 tuvieron el CIDR hasta el día 34 post monta.

### 3.5.5 Niveles de estradiol

Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos en las concentraciones plasmáticas de estradiol al día siete del protocolo de sincronización y al día cinco post monta natural. Sin embargo, al momento del estro no se encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de estradiol entre tratamientos ( $p > 0.05$ ; Cuadro 7).

Cuadro 7. Concentraciones plasmáticas de estradiol ( $\text{pg mL}^{-1}$ ) los días siete del protocolo de sincronización, al momento de la manifestación de estro y cinco días después de la monta por tratamiento (Media  $\pm$  error estándar).

Día	Tratamiento			
	1	2	3	4
7	94.9 $\pm$ 21.6 <sup>b</sup>	104.5 $\pm$ 19.2 <sup>ab</sup>	64.4 $\pm$ 13.4 <sup>b</sup>	135.3 $\pm$ 19.7 <sup>a</sup>
Estro	101.4 $\pm$ 20.2 <sup>a</sup>	102.8 $\pm$ 17.9 <sup>a</sup>	79.3 $\pm$ 25.3 <sup>a</sup>	105.1 $\pm$ 18.3 <sup>a</sup>
5d post monta	100.6 $\pm$ 20.2 <sup>ba</sup>	101.3 $\pm$ 18.2 <sup>ba</sup>	62.0 $\pm$ 12.5 <sup>b</sup>	114.8 $\pm$ 12.6 <sup>a</sup>

Literal diferente dentro de cada fila indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). T1: CIDR® + PGF2 $\alpha$ ; T2: CIDR® + PGF2 $\alpha$  + eCG; T3: CIDR® + PGF2 $\alpha$  + eCG + 1 CIDR® 7-17d; T4: CIDR® + PGF2 $\alpha$  + eCG + 1 CIDR® 7-34d.

### 3.5.6 Niveles de progesterona

Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos en las concentraciones plasmáticas de progesterona al día 17 post monta. Las ovejas de los grupos T3 y T4 (11.9 y 12.1  $\text{ng mL}^{-1}$ , respectivamente) tuvieron una concentración plasmática de progesterona más alta que las ovejas del grupo T1 (5.2  $\text{ng mL}^{-1}$ ;  $p < 0.05$ ; Cuadro 8). Adicionalmente, en el día 19 y 36 post monta no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en las concentraciones plasmáticas de progesterona entre los cuatro tratamientos. Por otro lado, en el día 34 post monta se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los niveles plasmáticos de progesterona, las ovejas del grupo T4 (13.4  $\text{ng mL}^{-1}$ ) tuvieron un nivel más elevado de progesterona que las ovejas de los grupos T1, T2 y T3 (7.7, 7.9 y 7.6, respectivamente; Cuadro 8).

Cuadro 8. Concentraciones plasmáticas de progesterona ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) en los días 17, 19, 34 y 36 días post monta en ovejas de pelo sincronizadas en la época reproductiva (Media  $\pm$  error estándar).

Día	Tratamiento			
	1	2	3	4
17	$5.2 \pm 0.8^b$	$8.3 \pm 0.6^{ab}$	$11.9 \pm 1.6^a$	$12.1 \pm 1.2^a$
19	$7.3 \pm 1.6^a$	$7.8 \pm 1.2^a$	$9.9 \pm 2.1^a$	$12.3 \pm 1.0^a$
34	$7.7 \pm 2.4^b$	$7.9 \pm 1.7^b$	$7.6 \pm 2.6^b$	$13.4 \pm 1.72^a$
36	$8.4 \pm 1.7^a$	$8.1 \pm 1.4^a$	$8.36 \pm 2.6^a$	$10.5 \pm 1.5^a$

Literal diferente dentro de cada fila indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). T1: CIDR® + PGF2 $\alpha$ ; T2: CIDR® + PGF2 $\alpha$  + eCG; T3: CIDR® + PGF2 $\alpha$  + eCG (1 CIDR® 7-17d); T4: CIDR® + PGF2 $\alpha$  + eCG (1 CIDR® 7-34d).

### 3.5.7 Identificación del gen *TP-1*

Se identificó el gen *TP-1* en las 40 ovejas sincronizadas (100%; 507 pb, Figura 9).

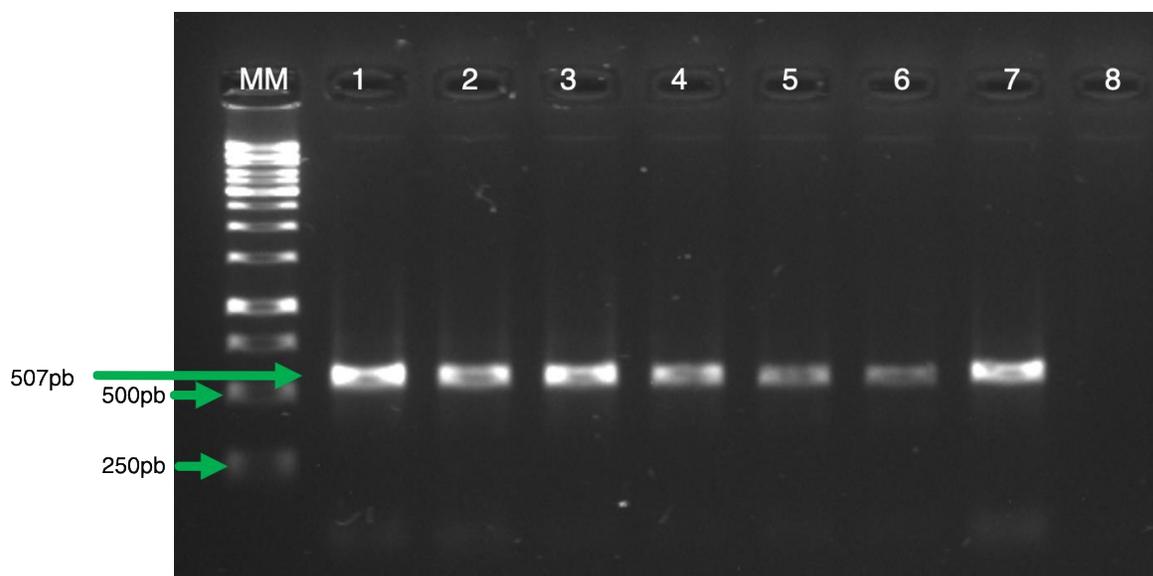


Figura 9. Amplificación del gen TP-1 en ovejas de pelo. Carril 1: MM= marcador molecular, carriles 1-7 muestras amplificadas (507 pb) y carril 8 testigo negativo.

### 3.5.8 Identificación de polimorfismos en el gen *TP-1*

De las 40 secuencias obtenidas, solo 28 tuvieron una calidad aceptable (94.8-98.8%) para su análisis bioestadístico. Las secuencias obtenidas en el presente estudio tuvieron una similitud de 99.9 y 99.9% con las secuencias X56345.1 y X07920.1, respectivamente, provenientes de USA y United Kingdom.

El alineamiento de las 28 secuencias del gen *TP-1* de las ovejas utilizadas en el presente estudio con las secuencias de referencia X56345.1 y X07920.1 mostraron la presencia de cuatro polimorfismos (Figura 10). Dos de las mutaciones encontradas son transversiones y las dos restantes son transiciones. Las dos transversiones son un cambio de pirimidinas por purinas (219 T>A) y (379 C<G), y las otras dos transiciones encontradas son entre purinas (449 G<A) y entre pirimidinas (514 T<C) de la secuencia de *TP-1*.

Species/Abbrev	*	*	*	*	Species/Abbrev	*	*	*	*	1. X56345.1_O	A	G	A	A	G	1. X56345.1_O	T	A	T	G	A	C								
1. X56345.1_O	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	2. X07920.1_AR	A	G	A	A	G	2. X07920.1_AR	T	A	T	G	A	C	
2. X07920.1_AR	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	3. PL5692_TP-	A	G	A	A	G	3. PL5692_TP-	T	A	T	G	A	C	
3. PL5692_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	4. PL43193_TP	A	G	A	A	G	4. PL43193_TP	T	A	T	G	A	C	
4. PL43193_TP	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	5. PL43174_TP	T	A	T	G	A	C	5. PL43174_TP	T	A	T	G	A	C
5. PL43174_TP	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	6. PL16116_TP	T	A	T	G	A	C	6. PL16116_TP	T	A	T	G	A	C
6. PL16116_TP	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	7. KT16_TP-1	A	G	A	A	G	7. KT16_TP-1	T	A	T	G	A	C	
7. KT16_TP-1	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	8. K797659_TP	A	G	A	A	G	8. K797659_TP	T	A	T	G	A	C	
8. K797659_TP	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	9. DC004_TP-1	A	G	A	A	G	9. DC004_TP-1	T	A	T	G	A	C	
9. DC004_TP-1	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	10. DC003_TP-	A	G	A	A	G	10. DC003_TP-	T	A	T	G	A	C	
10. DC003_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	11. DC002_TP-	A	G	A	A	G	11. DC002_TP-	T	A	T	G	A	C	
11. DC002_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	12. DA010_TP-	A	G	A	A	G	12. DA010_TP-	T	A	T	G	A	C	
12. DA010_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	13. DA007_TP-	A	G	A	A	G	13. DA007_TP-	T	A	T	G	A	C	
13. DA007_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	14. 0PL10_TP-	A	G	A	A	G	14. 0PL10_TP-	T	A	T	G	A	C	
14. 0PL10_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	15. 0KT20_TP-	A	G	A	A	G	15. 0KT20_TP-	T	A	T	G	A	C	
15. 0KT20_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	16. 0KT19_TP-	A	G	A	A	G	16. 0KT19_TP-	T	A	T	G	A	C	
16. 0KT19_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	17. 0KT15_TP-	A	G	A	A	G	17. 0KT15_TP-	T	A	T	G	A	C	
17. 0KT15_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	18. 0KT14_TP-	A	G	A	A	G	18. 0KT14_TP-	T	A	T	G	A	C	
18. 0KT14_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	19. 0DC06_TP-	A	G	A	A	G	19. 0DC06_TP-	T	A	T	G	A	C	
19. 0DC06_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	20. 0DC05_TP-	A	G	A	A	G	20. 0DC05_TP-	T	A	T	G	A	C	
20. 0DC05_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	21. 0DB25_TP-	A	G	A	A	G	21. 0DB25_TP-	T	A	T	G	A	C	
21. 0DB25_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	22. 0DB24_TP-	A	G	A	A	G	22. 0DB24_TP-	T	A	T	G	A	C	
22. 0DB24_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	23. 0DB18_TP-	A	G	A	A	G	23. 0DB18_TP-	T	A	T	G	A	C	
23. 0DB18_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	24. 00PL2_TP-	A	G	A	A	G	24. 00PL2_TP-	T	A	T	G	A	C	
24. 00PL2_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	25. 00KT8_TP-	A	G	A	A	G	25. 00KT8_TP-	T	A	T	G	A	C	
25. 00KT8_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	26. 00KT7_TP-	A	G	A	A	G	26. 00KT7_TP-	T	A	T	G	A	C	
26. 00KT7_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	27. 00KT4_TP-	A	G	A	A	G	27. 00KT4_TP-	T	A	T	G	A	C	
27. 00KT4_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	28. 00KT2_TP-	A	G	A	A	G	28. 00KT2_TP-	T	A	T	G	A	C	
28. 00KT2_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	29. 00DSN_TP-	A	G	A	A	G	29. 00DSN_TP-	T	A	T	G	A	C	
29. 00DSN_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G	30. 000BB_TP-	A	G	A	A	G	30. 000BB_TP-	T	A	T	G	A	C	
30. 000BB_TP-	T	C	T	G	C	A	G	A	C	C	A	G	A	G	A	G														

Figura 10. Polimorfismos del gen TP-1 en las posiciones 219, 379, 449 y 514 de dicho gen en ovejas de pelo.

Los polimorfismos en las posiciones 219 (posición 53 de la proteína y posición dos del codón), 379 (posición 106 de la proteína y posición 3 del codón) y 449 (posición 130 de la proteína y posición uno del codón) son mutaciones no sinónimas, las cuales producen una sustitución de aminoácido. En la posición 219 se sustituyó la leucina (L) por una glutamina (Q). En la posición 379 se sustituyó el ácido aspártico (D) por un ácido glutámico (E) y en la posición 449 se sustituyó el ácido glutámico (E) por una lisina (K). Mientras tanto, la mutación de la posición 514 (tercera del codón y 151 de la proteína) es sinónima o silenciosa; es decir, no produce un cambio de aminoácido en la proteína (Figura 11).

1. X56345.1_O	S	C	L	Q	D	R	Species/Abbrv	*	*	*	*	1. X56345.1	G	E	E	D	S		
2. X07920.1_AF	S	C	L	Q	D	R	1. X56345.1_O	L	L	D	Q	L	C	2. X07920.1	G	E	E	D	S
3. PL5692_TP-	S	C	L	Q	D	R	2. X07920.1_AF	L	L	D	Q	L	C	3. PL5692_	G	E	E	D	S
4. PL43193_TP-	C	Q	L	Q	D	R	3. PL5692_TP-	L	L	D	Q	L	C	4. PL43193_	G	E	E	D	S
5. PL43174_TP-	S	C	L	Q	D	R	4. PL43193_TP-	L	L	D	Q	L	C	5. PL43174_	G	E	E	D	S
6. PL16116_TP-	S	C	L	Q	D	R	5. PL43174_TP-	E	L	D	Q	L	C	6. PL16116_	E	K	D	S	
7. KT16_TP-1_f	S	C	L	Q	D	R	6. PL16116_TP-	L	L	D	Q	L	C	7. KT16_TP	G	E	E	D	S
8. K797659_TP-	S	C	L	Q	D	R	7. KT16_TP-1_f	L	L	D	Q	L	C	8. K797659_	G	E	E	D	S
9. DC004_TP-1	S	C	L	Q	D	R	8. K797659_TP-	L	L	D	Q	L	C	9. DC004_	G	E	E	D	S
10. DC003_TP-	S	C	L	Q	D	R	9. DC004_TP-1	L	L	D	Q	L	C	10. DC003_	G	E	E	D	S
11. DC002_TP-	S	C	L	Q	D	R	10. DC003_TP-	L	L	E	Q	L	C	11. DC002_	G	E	E	D	S
12. DA010_TP-	S	C	L	Q	D	R	11. DC002_TP-	L	L	D	Q	L	C	12. DA010_	G	E	E	D	S
13. DA007_TP-	S	C	L	Q	D	R	12. DA010_TP-	L	L	D	Q	L	C	13. DA007_	G	E	E	D	S
14. OPL10_TP-	S	C	L	Q	D	R	13. DA007_TP-	L	L	D	Q	L	C	14. OPL10_	G	E	E	D	S
15. OKT20_TP-	S	C	L	Q	D	R	14. OPL10_TP-	L	L	D	Q	L	C	15. OKT20_	G	E	E	D	S
16. OKT19_TP-	S	C	L	Q	D	R	15. OKT20_TP-	L	L	E	Q	L	C	16. OKT19_	G	E	E	D	S
17. OKT15_TP-	S	C	L	Q	D	R	16. OKT19_TP-	L	L	E	Q	L	C	17. OKT15_	G	E	E	D	S
18. OKT14_TP-	S	C	L	Q	D	R	17. OKT15_TP-	L	L	D	Q	L	C	18. OKT14_	G	E	E	D	S
19. ODC06_TP-	S	C	L	Q	D	R	18. OKT14_TP-	L	L	D	Q	L	C	19. ODC06_	G	E	E	D	S
20. ODC05_TP-	S	C	L	Q	D	R	19. ODC06_TP-	L	L	D	Q	L	C	20. ODC05_	G	E	E	D	S
21. ODB25_TP-	S	C	L	Q	D	R	20. ODC05_TP-	L	L	D	Q	L	C	21. ODB25_	G	E	E	D	S
22. ODB24_TP-	S	C	L	Q	D	R	21. ODB25_TP-	L	L	D	Q	L	C	22. ODB24_	G	E	E	D	S
23. ODB18_TP-	S	C	L	Q	D	R	22. ODB24_TP-	L	L	D	Q	L	C	23. ODB18_	G	E	E	D	S
24. 00PL2_TP-	S	C	L	Q	D	R	23. ODB18_TP-	L	L	D	Q	L	C	24. 00PL2_	G	E	E	D	S
25. 00KT8_TP-	S	C	L	Q	D	R	24. 00PL2_TP-	L	L	D	Q	L	C	25. 00KT8_	G	E	E	D	S
26. 00KT7_TP-	C	Q	L	Q	D	R	25. 00KT8_TP-	L	L	D	Q	L	C	26. 00KT7_	G	E	E	D	S
27. 00KT4_TP-	S	C	L	Q	D	R	26. 00KT7_TP-	L	L	D	Q	L	C	27. 00KT4_	G	E	E	D	S
28. 00KT2_TP-	S	C	L	Q	D	R	27. 00KT4_TP-	E	L	D	Q	L	C	28. 00KT2_	G	E	E	D	S
29. 00DSN_TP-	S	C	L	Q	D	R	28. 00KT2_TP-	L	L	D	Q	L	C	29. 00DSN_	G	E	E	D	S
30. 000BB_TP-	S	C	L	Q	D	R	29. 00DSN_TP-	L	L	D	Q	L	C	30. 000BB_	G	E	E	D	S
							30. 000BB_TP-	E	L	D	Q	L	C						

Figura 11. Polimorfismos del gen TP-1 en las posiciones 53, 106 y 130 de la proteína en ovejas de pelo.

### 3.5.9 Análisis de polimorfismos en el gen *TP-1*

El análisis de polimorfismos mediante la prueba de Tajima D evidenció que los SNP encontrados en el gen *TP-1* de las ovejas de pelo en el presente estudio son mutaciones deletéreas. El valor de  $\pi$  con respecto a  $\Theta$  indica que la selección ha contribuido para que se presenten un mayor número de alelos deletéreos en la muestra (Cuadro 9).

Cuadro 9. Prueba de Tajima (D) del gen TP-1.

Numero de secuencias	S	Sc	Sv	Ps	$\Theta$	$\pi$	D
28	11	431	4	0.0254	0.0065	0.0042	-1.1269

S: sitios segregantes; Sc: sitios conservados; Sv= sitios variables; Ps: sitios segregantes entre el número total de sitios;  $\Theta$ = cuatro por el tamaño efectivo poblacional por la tasa de mutación;  $\pi$ = diversidad nucleotídica; D: estadístico de Tajima.

### 3.6 DISCUSIÓN

La sincronización o inducción del estro es una herramienta útil para incrementar el porcentaje de gestación en las ovejas (Silva *et al.*, 2021). En total, un 77% (31/40) de las ovejas de pelo manifestaron estro. Este resultado es superior a lo reportado por Cadena-Villegas *et al.* (2018) en un estudio realizado en las mismas condiciones geográficas del presente estudio, pero en ovejas de lana sincronizadas con dos dosis de prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) y efecto macho (60.7 %). La mayoría de los protocolos se basan en el uso de una fuente de progesterona asociada con prostaglandina y eCG, con un periodo de mantenimiento del progestágeno de 12 a 14 días. Sin embargo, actualmente hay una tendencia a disminuir ese tiempo, porque los periodos de tratamiento más largos pueden causar una menor fertilidad al alterar el desarrollo folicular (Abecia *et al.*, 2012).

El tiempo de inicio al estro de los grupos T1 y T3 es mayor a lo que reportan Arroyo-Ledezma *et al.* (2013) en ovejas de pelo, a las cuales se les sincronizó el estro con un CIDR® y 400 UI de eCG (22.2 h). Por otro lado, los resultados del presente estudio con los grupos T2, T3 y T4 concuerdan con los resultados de inicio al estro (30.8 h) obtenidos por Nakafeero *et al.* (2020) en ovejas Merino Sudafricanas, las cuales fueron sincronizadas con un CIDR introducido por 9 días y una dosis de eCG (300 UI). La eficiencia de eCG para influir en el inicio al estro puede verse afectada por el momento de aplicación en relación con el protocolo de sincronización (Ali, 2007). En el presente estudio, la eCG se administró 48 h antes del retiro del CIDR, eso contribuyó a que las ovejas de T2 y T4 iniciaran estro más rápido porque se favorece el desarrollo folicular.

En las condiciones del presente estudio, la suplementación con progesterona no influyó en las tasas de retorno a estro. La suplementación con progesterona después de la monta ha tenido efectos inconsistentes en la tasa de gestación de ovejas (Kenyon *et al.*, 2005), aunque el momento y la duración de la suplementación con progesterona ha variado entre los diferentes estudios.

El porcentaje de gestación obtenido en los grupos T2 y T3 (70%) es similar a la tasa de gestación obtenida por Aké-Villanueva *et al.* (2017) en ovejas de pelo, a las cuales se les sincronizó el estro con dispositivos impregnados de progesterona y eCG e inseminadas a tiempo fijo (66.4%). El reconocimiento materno de la gestación es un proceso fisiológico en el que un embrión envía señales a la madre que establecen la extensión de la vida del cuerpo lúteo (CL), y por ende, la síntesis y liberación de P4 (Raheem, 2017).

Silva-Lombardo *et al.* (2020) reportan una tasa de gestación de 66.7% en ovejas Lacaune, a las cuales se les sincronizó el estro con dos dosis de PGF2 $\alpha$  y un intervalo de 9 días entre ellas; resultado similar a lo obtenido en los grupos T2 y T3 (70%) del presente estudio. La mortalidad embrionaria y fetal reduce los porcentajes de parto y, por lo tanto, la fecundidad; esto se traduce en pérdidas económicas en la producción ovina (Dixon *et al.*, 2007).

El mayor índice de prolificidad lo obtuvieron las ovejas del grupo T3 respecto de T1. Mientras tanto, las ovejas del grupo T1 tuvieron una baja prolificidad (1.0), al igual el grupo T2 (1.57). El resultado del grupo T1 es similar a lo reportado por Cueto *et al.* (2020) en ovejas Merino, las cuales se sincronizaron con progesterona y eCG (1.14). Por su parte, González-Garduño *et al.* (2010) reportan un índice de prolificidad de 1.27 en ovejas de la raza Pelibuey expuestas a un modelo productivo de partos acelerados; este valor es menor a los reportados en el presente estudio en los grupos T2, T3 y T4 (1.5, 1.8 y 1.7, respectivamente). La adición de eCG en el protocolo de sincronización del estro incrementó la prolificidad de las ovejas de pelo del presente estudio. Además, la suplementación de progesterona en los grupos T3 y T4 favoreció dicha variable.

Los resultados de fecundidad son similares a lo que encontraron Abdalla *et al.* (2014) en ovejas Barki, sincronizadas con un progestageno, una dosis de PGF2 $\alpha$  y una dosis de 750 UI de eCG (1.3). La gonadotropina crónica equina tiene actividad de FSH y regularmente se inyecta antes o al momento de retirar la fuente de progesterona en los protocolos de sincronización del estro. Se usa frecuentemente para estimular el ovario (Noakes *et al.*, 2019) y para mejorar el número de corderos nacidos (Ali, 2007). Se ha demostrado que la inyección de eCG al menos 24 h antes de la extracción del dispositivo

intravaginal impregnado con progesterona incrementa la tasa de parición, partos múltiples y tasas de fecundidad de ovejas (Hashim y Sembiring, 2013). La suplementación de progesterona en los grupos T3 y T4 tuvo un efecto positivo en la fecundidad de las ovejas en el presente estudio.

El estradiol tiene varias funciones fisiológicas en el aparato reproductor de las hembras (Zhang *et al.*, 2017). En el día 7 del protocolo de sincronización del estro, las concentraciones plasmáticas de estradiol fueron más altas en el grupo T4 (135.3 pg mL<sup>-1</sup>) con respecto al promedio de concentraciones plasmáticas de estradiol en el grupo T1 (94.9 pg mL<sup>-1</sup>) y el grupo T3 (64.4 pg mL<sup>-1</sup>). Las concentraciones plasmáticas de estradiol reportadas en los cuatro tratamientos del presente estudio son superiores a lo reportado por Meza Villalvazo *et al.* (2018) en un estudio en el que sincronizaron el estro de ovejas de la raza Pelibuey con dos aplicaciones de PGF2 $\alpha$ ; concentración de estradiol de 9.77 pg mL<sup>-1</sup> dos días antes de la segunda aplicación de PGF2 $\alpha$ . El momento de la administración de eCG influye en el desarrollo folicular y, por tanto, en las concentraciones plasmáticas de estradiol. Se considera a los niveles plasmáticos de estradiol como un buen parámetro de la calidad folicular (Hashim y Sembiring, 2013). Una mala calidad de los folículos origina producción baja de estradiol durante las etapas preovulatorias, lo que también pueden afectar la calidad de los ovocitos y la expresión de varias hormonas y factores de señalización en el oviducto que son cruciales para el desarrollo temprano del embrión. Estos factores también afectan la tasa de fertilidad (Bruno-Galarraga *et al.*, 2021). La adición de eCG durante el protocolo de sincronización del estro incrementó los niveles séricos de estradiol en las ovejas del T4 al día cinco post

monta. Sin embargo, al momento del estro no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en las concentraciones plasmáticas de estradiol entre los grupos.

Por su parte, Meza Villalvazo *et al.* (2018) reportan una concentración plasmática de estradiol en ovejas Pelibuey al momento del estro de  $13.64 \text{ pg mL}^{-1}$ . En un estudio realizado en ovejas Ghezel sincronizadas con un dispositivo liberador de progesterona y 550 UI de PMSG, Najafi *et al.* (2014) reportaron una concentración plasmática de  $17.7 \text{ pg mL}^{-1}$  al momento del estro. Este valor es menor a lo obtenido en los cuatro tratamientos del presente estudio. El estradiol causa la ovulación a través del incremento de LH, ya que el origina un efecto de retroalimentación positiva en la hipófisis (Pal y Rayees Dar, 2021).

Si hay alguna alteración en la secreción de estradiol y progesterona, producidos por un folículo y un CL de calidad deficiente, esto podría influir y afectar la sensibilidad del útero a la acción de los esteroides, que son vitales en el desarrollo embrionario (Fierro, 2010). Kuźnicka *et al.* (2016) midieron las concentraciones plasmáticas de estradiol ( $87.5 \text{ pg mL}^{-1}$ ) al día 6 post monta en ovejas Zelaznienska; este valor es superior al obtenido en las ovejas del grupo T3 en el presente estudio. Durante el proceso de implantación es importante que se dé una interacción simbiótica entre las concentraciones plasmáticas de estradiol y progesterona, las moléculas de adhesión, las citosinas y los factores de crecimiento que se expresan en el útero para que el embrión se implante exitosamente (Lei y Yang, 2010).

Se necesita una diferenciación organizada entre las células de la granulosa y las de la teca en un CL para suministrar suficiente progesterona que será necesaria para

desarrollar un ambiente intrauterino que favorezca la implantación, placentación y el crecimiento y desarrollo embrionario-fetal (Davis y LaVoie, 2019).

Las concentraciones plasmáticas de progesterona al día 17 post monta pueden estar relacionados con que las ovejas de los T3 y T4 tuvieron un CIDR® insertado desde el día 7 post monta. Aunque se encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de progesterona entre los tratamientos con suplemento de progesterona (T3 y T4) y T1 (sin suplemento) durante el periodo del reconocimiento materno de la gestación, esto no influyó en la tasa de gestación ni de parición en ninguno de los tratamientos. Esto coincide con lo que encontraron Diskin y Niswender (1989) en ovejas Corriedale a las que les suplementó progesterona. Por su parte, Torres-Lemus *et al.* (2018) midieron los niveles plasmáticos de progesterona al día 18 post inseminación artificial (14.3 ng mL<sup>-1</sup>) en ovejas Dorset primaras suplementadas con progesterona por 35 días; valor superior a lo reportado en los tres tratamientos del presente estudio a los días 17 y 19 post monta.

Las concentraciones plasmáticas de progesterona fueron similares el día 19 post monta para los cuatro tratamientos. Pero al día 34 post monta se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en las concentraciones plasmáticas de progesterona; las ovejas del grupo T4 (13.4 ng mL<sup>-1</sup>) tuvieron concentraciones más altas que las ovejas de los grupos T1 y T2 y T3 (7.7, 7.9 y 7.6 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Este resultado puede deberse a que las ovejas del T4 aún tenían un dispositivo CIDR® insertado el día 34 post monta. El resultado obtenido en el T1 es superior a lo que reportaron Najafi *et al.* (2014) al día 30 de gestación en ovejas Ghezel sincronizadas con un dispositivo liberador de progesterona y 550 UI de PMSG (1.24 ng mL<sup>-1</sup>). Por su parte, Torres-Lemus *et al.* (2018)

reportaron que ovejas Dorset suplementadas con progesterona tuvieron concentraciones plasmáticas de progesterona de  $7.33 \text{ ng mL}^{-1}$  al día 35 post inseminación; resultado similar a la medición realizada en el presente estudio en ovejas de pelo ( $T1=7.7$  y  $T2=7.9 \text{ ng mL}^{-1}$ ) al día 34 post monta. Hay que recordar que las ovejas de estos dos tratamientos no tenían suplemento de progesterona en dicho día. Se ha determinado que las concentraciones de progesterona o estradiol durante el proceso de placentación pueden influir en la sobrevivencia embrionaria y fetal tardía (López-Gatius *et al.*, 2004). Kleemann *et al.* (2001) reportaron que la suplementación de progesterona a corto plazo, en las primeras etapas de gestación podría incrementar la supervivencia de los embriones. Sin embargo, Ferraz *et al.* (2019) reportaron que en un protocolo de sincronización, un entorno endocrino preovulatorio con altas concentraciones de P4 circulante influye negativamente en el diámetro folicular, lo cual podría explicar las diferencias obtenidas en las variables prolificidad y fecundidad en este estudio.

En los bovinos se han identificado al menos 13 genes que codifican Interferón alfa (IFNA), 6 genes que codifican Interferón Beta (IFNB) y 24 genes que codifican Interferón omega (IFNW) (Walker y Roberts, 2009). Se ha encontrado algunas variantes del gen  $IFN\tau$  en bovinos, ovinos y caprinos. Aún no se sabe si estas variantes representan genes o variantes alélicas de algunos genes. También es posible que el número de genes  $IFN\tau$  cambie entre individuos y razas (Ealy y Wooldridge, 2017). Se logró amplificar el fragmento de 507 pb del gen *TP-1* en el 100% de las ovejas de pelo utilizadas en el presente estudio. De los amplicones secuenciados y secuencias obtenidas con calidad mayor a 94.8%, se identificaron cuatro polimorfismos, dos transversiones y dos transiciones. Las posiciones donde se ubican los polimorfismos respecto a la secuencia

del gen son: 219, 379, 449 y 514. El genoma tiene una gama de variaciones que van desde polimorfismos de un solo nucleótido y mutaciones específicas del locus hasta amplias aberraciones cromosómicas (Murugesan *et al.*, 2012).

Tres de los cuatro polimorfismos (219, 379 y 449) identificados producen una sustitución de aminoácido y la mutación de la posición 514 es sinónima; es decir, no produce un cambio de aminoácido en la proteína resultante. Se han identificado múltiples polimorfismos de *IFN $\tau$*  en bovinos, ovinos y caprinos. Estos genes y alelos de genes codifican proteínas que no muestran actividades antivirales, antiproliferativas y antiluteolíticas iguales, la necesidad de múltiples genes de *IFN $\tau$* , diferentes alelos y acciones distintas aún requiere estudiarse. Pero una hipótesis es que la variabilidad es necesaria para garantizar que exista una mejor oportunidad de que se desencadene el reconocimiento materno de la gestación (Ealy y Wooldridge, 2017). La naturaleza poligénica de los interferones de tipo I provoca que haya diferentes genes *IFN $\tau$*  que codifican proteínas con diferente actividad biológica (Goodbourn *et al.*, 2000). En los vacunos, ovinos y caprinos existen muchas formas polimórficas de *IFN $\tau$* , hay pruebas concluyentes de que estas diferentes formas tienen actividades biológicas diferentes. No obstante, aún se requiere hacer estudios para caracterizar y determinar las acciones de las proteínas *IFN $\tau$*  de forma individual y combinada en el útero (Ealy y Wooldridge, 2017).

El estadístico de Tajima D tuvo un valor negativo, lo que indica que los polimorfismos simples de un nucleótido encontrados en el gen *TP-1* no son neutrales y que las ovejas de pelo del presente estudio están bajo un proceso de selección negativa. Aún es necesario realizar investigaciones encaminadas a esclarecer si los polimorfismos

encontrados en el gen *TP-1* en las ovejas de pelo del presente estudio tienen alguna función en el proceso del reconocimiento materno de la gestación o en algún otro proceso.

### **3.7 CONCLUSIONES**

En este estudio, la aplicación de eCG redujo el tiempo al inicio de estro y el aporte exógeno de progesterona post-monta incrementó la fecundidad y favoreció la prolificidad en ovejas de pelo. No obstante, la suplementación de progesterona durante el periodo de reconocimiento materno de la gestación no mejoró la tasa de gestación en ovejas de pelo, pero se recomienda que realizar más investigaciones de este tipo con un mayor número de ovejas por tratamiento. La eCG no incrementó los niveles de estradiol al momento del estro ni mejoró los porcentajes de gestación ni parición, pero sí tuvo un efecto positivo en la prolificidad y fecundidad.

Se identificaron cuatro polimorfismos de nucleótido simple en el gen *TP-1* de ovejas de pelo; sin embargo, aún se requiere realizar más investigación para determinar si están implicados en alguna función durante el reconocimiento materno de la gestación.

### 3.8 LITERATURA CITADA

- Abdalla, E. B., Farrag, B., Hashem, A. L. S., Khalil, F. A., & Abdel-Fattah, M. S. (2014). Effect of progestagen, PGF $2\alpha$ , PMSG AND GnRH on estrus synchronization and some reproductive and productive traits in Barki ewes. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 20(1), 93–101.
- Abecia, J. A., Forcada, F., & González-Bulnes, A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130(3–4), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.011>
- Aké-Villanueva, J. R., Aké-López, J. R., Segura-Correa, J. C., Magaña-Monforte, J. G., & 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, 114–117. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.06.006>
- Ali, A. (2007). Effect of time of eCG administration on follicular response and reproductive performance of FGA-treated Ossimi ewes. *Small Ruminant Research*, 72(1), 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.07.017>
- Arroyo-Ledezma, J., De La Torre-Barrera, J., & Ávila-Serrano, N. Y. (2013). Respuesta reproductiva de ovejas de pelo sincronizadas con progesterona o prostaglandinas. *Agrociencia*, 47(7), 661–670.
- Bech-Sàbat, G., García-Ispuerto, I., Yániz, J., & López-Gatius, F. (2010). Therapeutic Approaches to Pregnancy Loss of Non-infectious Cause During the Late Embryonic/Early Foetal Period in Dairy Cattle. A Review: Therapeutics for Early Foetal Loss in Cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(6), e469–e475. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01562.x>
- Bizzarri, G., Napolitano, G., Wiedenhoefer, K., & Celis, N. (2011). *Ganadería mundial 2011 La ganadería en la seguridad alimentaria*. 156.
- Brooks, K., & Spencer, T. E. (2015). Biological Roles of Interferon Tau (IFNT) and Type I IFN Receptors in Elongation of the Ovine Conceptus<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 92(2). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.124156>
- Bruno-Galarraga, M., Cano-Moreno, V., Lago-Cruz, B., Encinas, T., Gonzalez-Bulnes, A., & Martinez-Ros, P. (2021). The Use of hCG for Inducing Ovulation in Sheep Estrus Synchronization Impairs Ovulatory Follicle Growth and Fertility. *Animals*, 11(4), 984. <https://doi.org/10.3390/ani11040984>
- Cadena-Villegas, S., Arevalo-Diaz, M., & Gallegos-Sanchez, J. (2018). Sincronización del estro en ovejas con PGF $2\alpha$  y bioestimuladas con “efecto macho”. *Abanico Veterinario*, 8(3), 94–105. <https://doi.org/10.21929/abavet2018.83.7>

- Cetin, Y., Sagcan, S., Gungor, O., Ozyurtlu, N., & Uslu, B. (2009). Effects of CIDR-G and Melatonin Implants, and their Combination on the Efficacy of Oestrus Induction and Fertility of Kilis Goats. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(4), 659–662. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01043.x>
- Cueto, M. I., Bruno-Galarraga, M. M., Fernandez, J., Fierro, S., & Gibbons, A. E. (2020). Addition of eCG to a 14 d prostaglandin treatment regimen in sheep FTAI programs. *Animal Reproduction Science*, 221, 106597. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106597>
- Dash, H. R., Shrivastava, P., & Das, S. (2020a). Collection, Transportation, and Preservation of Biological Evidences for DNA Analysis. En H. R. Dash, P. Shrivastava, & S. Das, *Principles and Practices of DNA Analysis: A Laboratory Manual for Forensic DNA Typing* (pp. 21–27). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0274-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0274-4_3)
- Dash, H. R., Shrivastava, P., & Das, S. (2020b). *Principles and Practices of DNA Analysis: A Laboratory Manual for Forensic DNA Typing*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0274-4>
- Davis, J. S., & LaVoie, H. A. (2019). Molecular Regulation of Progesterone Production in the Corpus Luteum. En *The Ovary* (pp. 237–253). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813209-8.00015-7>
- Diskin, M. G., & Niswender, G. D. (1989). Effect of Progesterone Supplementation on Pregnancy and Embryo Survival in Ewes. *Journal of Animal Science*, 67(6), 1559–1563. <https://doi.org/10.2527/jas1989.6761559x>
- Dixon, A. B., Knights, M., Winkler, J. L., Marsh, D. J., Pate, J. L., Wilson, M. E., Dailey, R. A., Seidel, G., & Inskeep, E. K. (2007). Patterns of late embryonic and fetal mortality and association with several factors in sheep1. *Journal of Animal Science*, 85(5), 1274–1284. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-129>
- Ealy, A. D., & Wooldridge, L. K. (2017). The evolution of interferon-tau. *Reproduction*, 154(5), F1–F10. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0292>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Fam and, A., Ns, I., & Alwan, A. (2010). Blood progesterone and estrogen hormones level during pregnancy and after birth in iraqi sheep and goat. *Basrah Journal of Veterinary Research*, 9(2), 153–157. <https://doi.org/10.33762/bvetr.2010.55059>
- Ferraz, P. A., Silva, M. A. A., Carôso, B. S. S., Araujo, E. A. B., Bittencourt, T. C. B. S. C., Chalhoub, M., Bittencourt, R. F., & Ribeiro Filho, A. L. (2019). Effect of eCG on the follicular dynamics and vascularization of crossbred cows with different circulating progesterone concentrations during synchronization of ovulation in an

FTAI protocol. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 39(5), 324–331. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5520>

- Fierro, S. A. F. (2010). Pérdidas reproductivas en ovejas sincronizadas con prostaglandina. Tesis de maestría en Reproducción Animal. Universidad de la Republica. Uruguay.
- González-Garduño, R., Torres-Hernández, G., & Arece-García, J. (2010). Comportamiento productivo y reproductivo de ovinos Pelibuey en un sistema de pariciones aceleradas con tres épocas de empadre al año. 28, 6.
- Goodbourn, S., Didcock, L., & Randall, R. E. (2000). Interferons: Cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *Journal of General Virology*, 81(10), 2341–2364. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-10-2341>
- Hashim, N. H., & Sembiring, M. (2013). Time of PMSG administration: Effect on progesterone and estradiol concentration in synchronized ewes. *Biomed Res*, 24(1), 6.
- Kasimanickam, R. K., & Kasimanickam, V. R. (2020). IFNT, ISGs, PPARs, RXRs and MUC1 in day 16 embryo and endometrium of repeat-breeder cows, with or without subclinical endometritis. *Theriogenology*, 158, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.09.001>
- Kenyon, P., Morris, S., & West, D. (2005). The effect of progesterone supplementation post mating and shearing of ewes in early pregnancy on the reproductive performance of ewes and birthweight of lambs. *New Zealand Veterinary Journal*, 53(5), 321–325. <https://doi.org/10.1080/00480169.2005.36567>
- Kim, M.-S., Min, K.-S., Seong, H.-H., Kim, C.-L., Jeon, I. S., Kim, S. W., & Imakawa, K. (2018). Regulation of conceptus interferon-tau gene subtypes expressed in the uterus during the peri-implantation period of cattle. *Animal Reproduction Science*, 190, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.01.005>
- Kleemann, D. O., Walker, S. K., Hartwich, K. M., Fong, L., Seamark, R. F., Robinson, J. S., & Owens, J. A. (2001). Fetoplacental Growth in Sheep Administered Progesterone during the First Three Days of Pregnancy. *Placenta*, 22(1), 14–23. <https://doi.org/10.1053/plac.2000.0594>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kuźnicka, E., Rant, W., Radzik-Rant, A., Kunowska-Slósarz, M., & Balcerak, M. (2016). The ovulation rate, plasma progesterone and estradiol concentration, and litter size of a local ewe breed kept in a barn vs. Those kept under an overhead shelter. *Archives Animal Breeding*, 59(1), 145–150. <https://doi.org/10.5194/aab-59-145-2016>

- Lei, W., & Yang, Z.-M. (2010). [Molecular regulatory network in embryo implantation]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan [Progress in Physiology]*, 41(6), 417–422.
- López-Gatiús, F., Santolaria, P., Yániz, J. L., & Hunter, R. H. F. (2004). Progesterone supplementation during the early fetal period reduces pregnancy loss in high-yielding dairy cattle. *Theriogenology*, 62(8), 1529–1535. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.02.005>
- Maidin, M. S., Blackberry, M. A., Milton, J. T. B., Hawken, P. A. R., & Martin, G. B. (2014). Nutritional Supplements, Leptin, Insulin and Progesterone in Female Australian Cashmere Goats. *APCBEE Procedia*, 8, 299–304. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.03.044>
- Martinez-Ros, P., S, A., E, G.-R., A, R.-A., & A, G.-B. (2018). Effects of short-term intravaginal progestagens on the onset and features of estrus, preovulatory LH surge and ovulation in sheep. *Animal Reproduction Science*, 197, 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.046>
- Meza Villalvazo, V. M., Rojas Marquez, C. A., Sandoval Castro, C., Magana Sevilla, H., & Trejo Cordova, A. (2018). Corn oil enhances progesterone and estradiol plasma levels in tropical hair sheep. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 5(15), 583. <https://doi.org/10.19136/era.a5n15.1511>
- Murugesan, G., Jang, S., & Han, J.-Y. (2012). Single Nucleotide Polymorphisms in Molecular Diagnostics. En K. Kottke-Marchant & B. H. Davis (Eds.), *Laboratory Hematology Practice* (pp. 168–180). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781444398595.ch15>
- Naitana, S., & Ledda, S. (2020). Reproductive technologies in sheep. En *Reproductive Technologies in Animals* (pp. 31–54). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817107-3.00003-5>.
- Najafi, G., Cedden, F., Maleki, S., & Najafi, G. (2014). The Determination of Plasma Progesterone, Estradiol-17 $\beta$  Hormone Levels in Ghezel Sheep treated with CIDR and Various Doses of PMSG during the Breeding Season. 3, 5.
- Nakafeero, A., Hassen, A., & Lehloenya, K. C. (2020). Investigation of ram effect and eCG usage in progesterone based oestrous synchronization protocols on fertility of ewes following fixed time artificial insemination. *Small Ruminant Research*, 183, 106034. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.106034>
- Noakes, D. E., Parkinson, T. J., & England, G. C. W. (Eds.). (2019). *Veterinary reproduction and obstetrics* (Tenth edition). Elsevier.
- Pal, P., & Rayees Dar, M. (2021). Induction and Synchronization of Estrus. En F. Aral, R. Payan-Carreira, & M. Quaresma (Eds.), *Animal Reproduction in Veterinary Medicine*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90769>

- Raheem, K. A. (2017). An insight into maternal recognition of pregnancy in mammalian species. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.01.002>
- Silva, R. O. da, Oliveira, R. P. M. de, Silva, A. F., Oliveira, F. F. de, Rufino, J. P. F., Silva, M. L. M. da, Silva, R. O. da, Oliveira, R. P. M. de, Silva, A. F., Oliveira, F. F. de, Rufino, J. P. F., & Silva, M. L. M. da. (2021). Effect of different protocols for estrus synchronization on reproductive performance of Santa Inês ewes under Amazon environmental conditions. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 43. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v43i1.48954>
- Silva Lombardo, H. N., Santos Monteiro, C. A., Delgado, K. F., Pinna, A. E., Vasconcelos, C. O. de P., Garcia Nogueira, L. A., Brandão, F. Z., & Balara, M. F. A. (2020). Hormonal Protocols for the Synchronization and Induction of Synchronized Estrus in Dairy Ewes Kept under Tropical Conditions. *Acta Scientiae Veterinariae*, 48. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.102644>
- Tajima, F. (1989). Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595.
- Thompson, J. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876–4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- Torres-Lemus, F., Sánchez-Torres, M. T., Nieto-Aquino, R., Salinas-Ríos, T., Figueroa-Velasco, J. L., Martínez-Aispuro, J. A., Cordero-Mora, J., Rodríguez-Ortega, L. T., Vargas-Monter, J., Campero-Cruz, A., & Noriega-Trinidad, V. (2018). Influencia del aporte exogeno de progesterona (cidr) post-inseminacion artificial en ovejas primilas. *AGROProductividad*, 11(6), 114–120.
- Walker, A. M., & Roberts, R. M. (2009). Characterization of the bovine type I IFN locus: Rearrangements, expansions, and novel subfamilies. *BMC Genomics*, 10(1), 187. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-187>
- Zhang, S., Yu, L., Qu, T., Hu, Y., Yuan, D., Zhang, S., Xu, Q., Zhao, Y., Zhang, J., & Yue, L. (2017). The Changes of Cytoskeletal Proteins Induced by the Fast Effect of Estrogen in Mouse Blastocysts and Its Roles in Implantation. *Reproductive Sciences*, 24(12), 1639–1646. <https://doi.org/10.1177/1933719117697126>

**CAPITULO 4. INFLUENCIA DE HORMONAS EXÓGENAS EN VARIABLES  
REPRODUCTIVAS E IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN ISG15 EN  
OVEJAS DE LA RAZA RIDEAU ARCOTT**

**4.1 RESUMEN**

Hay varios factores que influyen en la productividad de las ovejas en las unidades de producción, mejorar las variables e indicadores reproductivos en las ovejas es uno de los factores clave para aumentar la rentabilidad. El desarrollo de tecnologías de genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) ha contribuido al progreso en la selección de animales. El gen estimulado por el interferón 15 (*ISG15*) desempeña funciones biológicas importantes en la receptividad uterina y la implantación del embrión. Los objetivos del presente estudio fueron: 1) evaluar la influencia de hormonas exógenas en la respuesta de variables reproductivas, medición de niveles plasmáticos de progesterona y 2) identificar polimorfismos en el gen *ISG15* en ovejas Rideau Arcott de  $4.2 \pm 0.32$  años y un peso de  $58.8 \pm 1.58$  Kg, en la época reproductiva. No se encontraron diferencias ( $p > 0.05$ ) en la manifestación de estro, retorno a estro, gestación, parición, prolificidad y fecundidad. Se encontraron diferencias ( $p < 0.05$ ) en el inicio al estro y niveles de progesterona el día 24 post estro. Se identificaron tres polimorfismos en el gen *ISG15*, dos son mutaciones sinónimas y uno si produce una mutación no sinónima. La suplementación de progesterona no mejoró los porcentajes de gestación y parición, ni las tasas de prolificidad y fecundidad en ovejas de la raza Rideau Arcott. Se requiere realizar más investigación para determinar si las mutaciones identificadas están involucradas en alguna función en el reconocimiento materno de la gestación de la oveja.

**Palabras clave:** hormonas, progesterona, Rideau Arcott, gen, *ISG15*.

#### 4.2 ABSTRACT

There are several factors that influence the productivity of sheep in production units, improving the reproductive variables and indicators in sheep is one of the key factors to increase profitability. The development of single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping technologies has contributed to progress in the selection of animals. The gene stimulated by interferon 15 (*ISG15*) plays important biological roles in uterine receptivity and embryo implantation. The aims of the present study were: 1) to evaluate the influence of exogenous hormones on the response of reproductive variables, measurement of plasma progesterone levels and 2) to identify polymorphisms in the *ISG15* gene in Rideau Arcott ewes aged  $4.2 \pm 0.32$  years and a weight of  $58.8 \pm 1.58$  Kg, in the reproductive season. No differences were found ( $p > 0.05$ ) in the manifestation of oestrus, return to oestrus, gestation, parturition, prolificacy and fertility. Differences ( $p < 0.05$ ) were found in the onset of estrus and progesterone levels on day 24 post-estrus. Three polymorphisms were identified in the *ISG15* gene, two are synonymous mutations and one if it produces a non-synonymous mutation. Progesterone supplementation did not improve gestation and calving percentages, nor prolificacy and fertility rates in Rideau Arcott ewes. Further research is required to determine whether the identified mutations are involved in any role in maternal recognition of sheep's gestation.

**Key words:** hormones, progesterone, Rideau Arcott, gene, *ISG15*.

### 4.3 INTRODUCCIÓN

Hay varios factores que influyen en la productividad de las ovejas en las unidades de producción (Farias Machado *et al.*, 2020; Segerkvist *et al.*, 2020) y mejorar las variables e indicadores reproductivos en las ovejas es uno de los factores clave para aumentar la rentabilidad en tales unidades de producción (Mahdavi *et al.*, 2014). Uno de ellos es el número de óvulos liberados, dependiendo de la raza puede variar entre uno y varios (Abdoli *et al.*, 2016). Dicha tasa de ovulación se puede incrementar mediante la aplicación de hormonas exógenas, como la gonadotropina coriónica equina (eCG; Coffman y Pinto, 2016), la hormona folículo estimulante (FSH; Padmanabhan y Cardoso, 2020), la gonadotropina coriónica humana (hCG; Dias *et al.*, 2020) y la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH; Fernández *et al.*, 2019). Una de las características de la eCG es su marcada actividad de FSH y hormona luteinizante (LH); en ovinos se une a los receptores de FSH y prácticamente en todas las especies de mamíferos y produce la estimulación del desarrollo folicular (Murphy y Martinuk, 1991). Además de las hormonas mencionadas anteriormente, también se utilizan los progestágenos (Bragança *et al.*, 2021), asociados con el uso de gonadotropinas para la manipulación hormonal de la función ovárica, con el fin de utilizar las tecnologías de reproducción asistida (Kuang *et al.*, 2015). Las acciones de la progesterona en el útero son esenciales para la sobrevivencia y el crecimiento del *conceptus* en las ovejas (Spencer *et al.*, 2016). Las concentraciones elevadas de progesterona después de la ovulación mejoran la elongación del *conceptus* en ovejas, mientras que concentraciones más bajas de progesterona retardan el desarrollo embrionario (Lonergan y Sánchez, 2020). En las ovejas, los progestágenos se insertan por vía intravaginal con el uso de esponjas o

dispositivos (CIDR) impregnados con progestágeno durante periodos desde 3 (Swelum *et al.*, 2018) hasta 14 días (Cueto *et al.*, 2020). El tratamiento incluye administrar eCG al momento de remover el dispositivo impregnado con progestágeno; la dosis de eCG varía entre 250-500 UI, lo cual depende de la edad, temporada y raza (Abecia *et al.*, 2011).

En los años recientes también se ha realizado investigación enfocada a comprender el mecanismo relacionado con el reconocimiento materno de la gestación y la implantación del embrión en la oveja, con la finalidad de presentar soluciones prácticas que permitan disminuir la tasa de mortalidad embrionaria en los rebaños (Bairagi *et al.*, 2018; Alak *et al.*, 2020). Por ejemplo, el desarrollo de tecnologías de genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) ha contribuido al progreso en la selección de animales (Gholizadeh *et al.*, 2015). En la actualidad se sabe que el gen estimulado por el interferón 15 (*ISG15*) desempeña funciones biológicas importantes en la receptividad uterina y la implantación del embrión (Haq *et al.*, 2016; Dzimianski *et al.*, 2019). El objetivo del presente estudio fue evaluar la influencia de hormonas exógenas en la respuesta de variables reproductivas, medición de niveles plasmáticos progesterona e identificación de polimorfismos en el gen *ISG15* en ovejas de la raza Rideau Arcott.

## 4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.4.1 Localización

El estudio se realizó en la granja experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en la Calle del Río 107, San Diego, 56200, Texcoco de Mora, México. La localización geográfica es: N 19° 29' 45.092", O 98° 52' 8.461", a una altura de 2,257 msnm. El clima es templado semiseco, con una temperatura media anual de 15.9°C, con heladas poco frecuentes y una precipitación pluvial media anual de 686.0 mm (García, 2004).

### 4.4.2 Animales

Se utilizaron 40 ovejas Rideau Arcott de  $4.2 \pm 0.32$  años y un peso de  $58.8 \pm 1.58$  Kg con historial reproductivo, en la época reproductiva. En el experimento, las ovejas se mantuvieron en corrales con sombra, piso con cemento, comederos y bebederos. Se proporcionó una dieta a base de ensilado de maíz ( $5.5 \text{ Kg oveja}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) con  $2.49 \text{ Mcal Kg}^{-1}$  de EM. Se suplementó con  $350 \text{ g oveja}^{-1}$  de alimento concentrado. Previo al experimento, se realizó la aplicación de antiparasitario vitaminado (PARMISOLE ADE+B®, PARFARM, México) vía intramuscular, de acuerdo a la recomendación del laboratorio para la especie. Los machos se mantuvieron en corrales separados con las mismas condiciones de alojamiento y manejo general que las ovejas.

### 4.4.3 Tratamientos

Las 40 ovejas fueron distribuidas aleatoriamente en cada uno de los cuatro tratamientos: T1 (n=10), dispositivo vaginal con progesterona (CIDR®) y prostaglandina F2 alfa

(PGF2 $\alpha$ ); T2 (n=10), CIDR® y PGF2 $\alpha$  más dos CIDR® desde el día 7 post inseminación hasta el día 34; T3 (n=10), CIDR® y PGF2 $\alpha$  más eCG al séptimo día del protocolo de sincronización y T4 (n=10), CIDR® y PGF2 $\alpha$  más eCG al séptimo día del protocolo de sincronización y dos CIDR® desde el día 7 post inseminación hasta el día 34 (Figura 12).

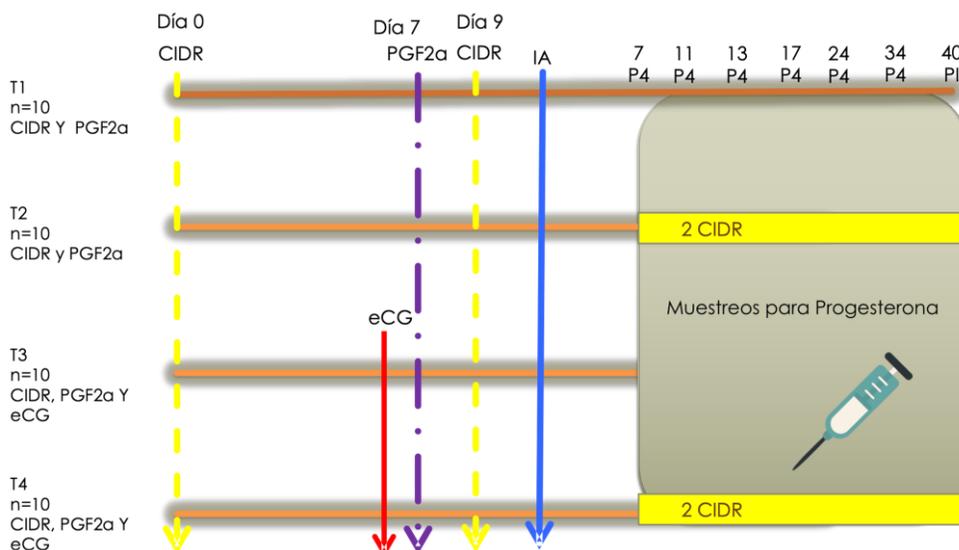


Figura 12. Distribución de los tratamientos de sincronización de estrógeno utilizados en ovejas Rideau Arcott.

#### 4.4.4 Presincronización y sincronización del estrógeno

A todas las ovejas se les realizó una presincronización con dos dosis de prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ; 5 mg de Dinoprost trometamina, Lutalyse®, Zoetis, USA), con un intervalo de 11 días, a los -18 y -7 días. Luego se realizó la sincronización del estrógeno (día cero) mediante dispositivos vaginales (CIDR®, con 0.3 g de progesterona (Zoetis, Hamilton, Nueva Zelanda) que permanecieron por nueve días en las ovejas. Y al séptimo día, se les aplicó una dosis de PGF2 $\alpha$  (5 mg de Dinoprost trometamina, Lutalyse®, Zoetis, USA). En el caso de las ovejas de los tratamientos T3 y T4, se les aplicó una

dosis de 500 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG, Folligon® Intervet, Boxmeer, Holanda) y en aquellos tratamientos T2 y T4, se les insertaron 2 CIDR® vaginales desde el día 7 post inseminación y permanecieron hasta el día 34.

#### 4.4.5 Detección de estros e inseminación artificial

La detección de los estros se realizó con intervalos de cada 4 h, desde la extracción de los dispositivos (CIDR®) y durante un periodo de 72 h. Se utilizaron machos celadores provistos con mandil para evitar la copula. Las ovejas que manifestaron estro se aislaron y se les restringió alimento hasta el momento de la inseminación. Todas las ovejas se inseminaron artificialmente vía laparoscopia. Se utilizó una pajilla de  $0.25 \text{ mL}^{-1}$  y les aplicó una dosis de espermatozoides de  $100 \times 10^6$ , la cual fue depositada directamente en los cuernos uterinos. Para realizar el procedimiento de la inseminación artificial (IA), las ovejas se colocaron en una camilla, con una inclinación de  $45^\circ$  para inmovilizarlas. Luego se procedió a lavar y desinfectar el área para realizar las punciones con los trócares y realizar la IA vía laparoscopia.

#### 4.4.6 Retorno a estro

Para medir la tasa de retorno a estro, desde el día 15 al 19 (primer retorno) y del día 32 al 36 (segundo retorno), se introdujeron sementales celadores provistos con un mandil para evitar la copula, durante una hora por la mañana y una hora por la tarde a cada uno de los corrales con las ovejas inseminadas.

#### 4.4.7 Diagnóstico de gestación y porcentaje de parto

Se realizó el diagnóstico de gestación mediante una ecografía al día 40 después de la IA con un ultrasonido (Universal medical systems, Inc. UMS 900). El número de ovejas Rideau Arcott gestantes se registró respecto a las ovejas inseminadas y, se confirmó al momento del parto con respecto a las ovejas tratadas o sincronizadas.

#### 4.4.8 Prolificidad y fecundidad

Para determinar estas dos variables, se atendieron los partos con la finalidad de contabilizar el número de corderos nacidos por cada oveja parida (prolificidad) y por el total de ovejas en el tratamiento (fecundidad).

#### 4.4.9 Análisis de niveles plasmáticos de progesterona

Se recolectaron muestras de sangre de las 40 ovejas Rideau Arcott directamente de la vena yugular en tubos Vacutainer® (BD, NJ, USA), bajo los criterios de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999; SAGARPA, 2001) sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, en concordancia con las regulaciones para el uso y cuidado de animales de investigación, aprobado por el Consejo General Académico de Colegio de Postgraduados, México (COLPOS, 2016). Las muestras de sangre se recolectaron los días 7, 11, 13, 17, 24, 34 y 40 después de la manifestación del estro. El suero se separó mediante centrifugación a una fuerza centrífuga relativa (RCF) 706 x g durante 20 min, luego se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se almacenó a -20° C hasta su análisis posterior. Las concentraciones séricas de progesterona se midieron mediante un kit de ELISA comercial DRG Products (DRG

Instruments GmbH, Marburg, Alemania) con un rango de 0 – 40 ng mL<sup>-1</sup> y una sensibilidad (0.045 ng mL<sup>-1</sup>). Los procedimientos de inmunoensayo se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante y las lecturas de absorbancias se realizaron mediante un fotómetro automático (MRX Microplate Reader, Dynatech Laboratories®, EUA). Las muestras se analizaron en el laboratorio de Reproducción-Endocrinología de la Universidad Nacional Autónoma de México de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

#### 4.4.10 Análisis molecular del gen ISG15

Se recolectaron muestras de sangre de las 40 ovejas Rideau Arcott directamente de la vena yugular y se depositaron en tarjetas Tecnología Asociada Flinders o por sus siglas en inglés FTA Whatman TM Elute Cards (GE Whatman, Maidstone, Kent, United Kingdom) directamente 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.*, 2020b). Las tarjetas se secaron 30 min para ser colocadas en sobres etiquetados individuales y se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente (Dash *et al.*, 2020a) para su análisis posterior. En el laboratorio se purificó el ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir de las tarjetas Whatman FTA. Se realizó un corte de aproximadamente 0.5mm de diámetro y ese trozo de tarjeta se introdujo en un tubo Eppendorf de 0.2 mL. Luego se procedió con la fase de lavado que consistió en agregar 200 µL de reactivo de purificación FTA reagent por 5 min. Una vez que pasaron los 5 min, el reactivo usado se desechó mediante decantación (esto se repitió tres veces). Después se le agregó al trozo de tarjeta, 200µL de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0) a temperatura ambiente por 5 min. Una vez que pasaron los 5 minutos, el buffer

usado se desechó mediante decantación (esto se repitió dos veces). El gen *ISG15* se amplificó mediante la PCR. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 12.5  $\mu$ L, con 6.25  $\mu$ L de mezcla maestra de reacción para PCR (Master Mix 2X, Promega© Madison, Wisconsin, USA), 0.625  $\mu$ L para cada iniciador (10 mM) del gen *ISG15*; For-5'- ATTCACTACGCTGCATGGGG -3'; Rev-5'- GCTGCATGTGCAGTAGTCCC -3', número de acceso, NC\_019469.2 (The International Sheep Genomics Consortium *et al.*, 2010) y 5  $\mu$ L de dihidrato de trehalosa Fluka® al 10 % (en agua libre de nucleasas y proteasas, Merck© KGaA 64271, Darmstadt, Alemania). Los tubos con el fragmento de la tarjeta procesada y la mezcla de reacción, ya homogenizada, se colocaron en un termociclador C1000 (Bio Rad, California, USA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial, 95 °C por cuatro min, luego 35 ciclos (desnaturalización 95 °C por 30 s, alineamiento 62 °C por 40 s y extensión 72 °C, 40 s) y extensión final 72 °C por 10 min. Los amplicones resultantes se separaron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% con un buffer de corrida TAE 1x Tris-Acetato-EDTA 1x (Merck© KGaA 64271, Darmstadt, Alemania) con un voltaje de 80 por 45 min; buffer de carga Loading Dye 6x y marcador molecular  $\Phi$ X174 DNA-Hae III (New England BioLabs, MA, USA). El gel se tiñó con GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, SFO Bay Area, USA). Posteriormente el gel se reveló en un fotodocumentador (Equipar®, México). Esta fase se realizó en los laboratorios de biología molecular de los Posgrados de Genética y Fitosanidad, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados.

#### 4.4.11 Secuenciación y análisis de secuencias

Para la limpieza y secuenciación de los amplicones obtenidos, se enviaron (10µL) a la empresa MACROGEN© (Seúl, Corea del Sur). En el National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) se realizó una búsqueda de secuencias similares mediante la función Nucleotide BLAST y se seleccionaron las secuencias de referencia FJ844480 y NM\_001009735 por el porcentaje de similitud con las secuencias obtenidas. El análisis de la calidad de las secuencias de ADN fue realizado en el software Geneious Prime® versión 2019.0.4. Los alineamientos de las secuencias se realizaron en el programa ClustalW (Thompson, 1997), incluido en el software Mega 7 (Kumar *et al.*, 2016).

#### 4.4.12 Análisis estadístico

La variable manifestación de estros se analizó mediante el modelo de regresión logística con el procedimiento Logistic. La variable inicio al estro se analizó con el método de curvas de sobrevivencia Log-Rank mediante el procedimiento Life Test; la prueba de comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ). Las variables retorno al estro, porcentaje de gestación y de parto, prolificidad y fecundidad fueron analizadas con una regresión binomial negativa mediante el procedimiento (GENMOD), presentados como medias  $\pm$  error estándar. Las diferencias fueron consideradas significativas si  $p<0.05$ . La concentración de progesterona fue analizada con el procedimiento GLM y se utilizó la prueba de Duncan para comparar los tratamientos. En todos los análisis se utilizó SAS versión 9.4 (Institute Inc., Cary, NC, USA). Las covariables de peso y la edad no fueron significativas ( $p>0.05$ ) en cada uno de los

modelos estadísticos usados, lo cual indica que no influyeron en la respuesta a los tratamientos utilizados. Y se usó la prueba de neutralidad de Tajima's D (Tajima, 1989) para probar la hipótesis de que todas las mutaciones observadas son selectivamente neutrales.

## 4.5 RESULTADOS

### 4.5.1 Manifestación e inicio del estro

No se encontraron diferencias en la manifestación de estro en ovejas Rideau Arcott ( $p>0.05$ ). Todas las ovejas de los tratamientos T1, T2 y T4 manifestaron un 100% de estro y un 90% en el grupo T3. Por su parte, se encontraron diferencias significativas en el inicio al estro ( $p<0.05$ ); las primeras ovejas en iniciar estro fueron las del tratamiento T4, luego continuaron las ovejas de los tratamientos T2 y T3 y al final terminaron las ovejas del tratamiento T1 (Cuadro 10).

Cuadro 10. Tiempo de inicio al estro de ovejas Rideau Arcott con diferentes tratamientos para la sincronización del estro (Media  $\pm$  error estándar).

Tratamiento	N	Tiempo (h)
T1	10	32.4 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>
T2	10	29.2 $\pm$ 3.5 <sup>ab</sup>
T3	10	26 $\pm$ 6.4 <sup>ab</sup>
T4	10	14.4 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>

Literal diferente dentro de cada columna indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). T1: CIDR Y PGF2 $\alpha$ ; T2: CIDR y PGF2 $\alpha$  + 2 CIDR; T3: CIDR, PGF2 $\alpha$  y eCG y T4: CIDR, PGF2 $\alpha$  y eCG + 2 CIDR

En la Figura 13 se muestran las curvas de supervivencia para inicio del estro en ovejas Rideau Arcott tratadas.

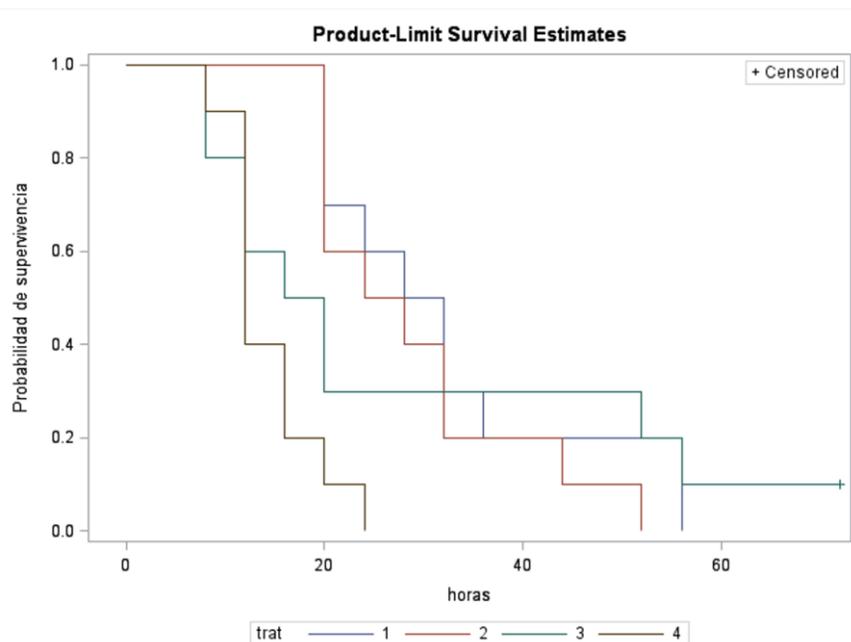


Figura 13. Curvas de supervivencia para el inicio del estro en ovejas Rideau Arcott de los tratamientos, formadas por los estimadores de supervivencia de Kaplan-Meier a diferentes tiempos por tratamiento ( $p < 0.05$ ). LOG RANK ( $p = 0.03482$ ). T1: CIDR Y PGF2 $\alpha$ ; T2: CIDR y PGF2 $\alpha$  + 2 CIDR; T3: CIDR, PGF2 $\alpha$  y eCG y T4: CIDR, PGF2 $\alpha$  y eCG + 2 CIDR.

#### 4.5.2 Retorno a estro

La tasa de retorno a estro (día 17) fue similar entre los grupos T1 (30%) y T3 (10%;  $p > 0.05$ ). Sin embargo, para los grupos T2 y T4 no existió este dato debido a que estas

ovejas tuvieron dos CIDR® hasta el día 34 post monta. No se encontraron diferencias en la tasa de retorno a estro (día 34) entre los cuatro tratamientos (T1: 40%; T2: 40%; T3: 20% y T4: 20%,  $p>0.05$ ).

#### 4.5.3 Porcentaje de gestación y de parto

No se encontraron diferencias en el porcentaje de gestación (T1: 50%, T2: 60%, T3: 70% y T4: 80%) ni de parto (T1: 50%, T2: 60%, T3: 70% y T4: 80%) en las ovejas Rideau Arcott entre los cuatro tratamientos ( $p>0.05$ ).

#### 4.5.4 Prolificidad y fecundidad

No se encontraron diferencias ( $p>0.05$ ) en la prolificidad de ovejas Rideau Arcott, entre los cuatro tratamientos: T1 ( $1.8 \pm 0.34^a$ ); T2 ( $1.66 \pm 0.29^a$ ); T3 ( $1.71 \pm 0.29^a$ ) y T4 ( $1.87 \pm 0.34^a$ ). La cantidad de corderos nacidos por cada oveja del tratamiento (Fecundidad) fue similar ( $p>0.05$ ) en todos los tratamientos: T1 ( $1.0 \pm 0.49^a$ ); T2 ( $1.0 \pm 0.38^a$ ); T3 ( $1.2 \pm 0.34^a$ ) y T4 ( $1.5 \pm 0.23^a$ ).

#### 4.5.5 Niveles de progesterona

No se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en las concentraciones de progesterona en los días 7, 11, 13, 17, 34 y 40. Sin embargo, en el día 24 post estro, las ovejas del T4 tuvieron un promedio de concentración plasmática de progesterona más alto ( $p<0.05$ ;  $20.85 \pm 2.65$  ng mL<sup>-1</sup>) que el resto de los grupos; T1 ( $12.14 \pm 3.61$  ng mL<sup>-1</sup>), T2 ( $12.53 \pm 2.74$  ng mL<sup>-1</sup>) y T3 ( $16.75 \pm 2.72$  ng mL<sup>-1</sup>), respectivamente (Cuadro 11).

Cuadro 11. Concentraciones plasmáticas de progesterona (ng mL<sup>-1</sup>) de los días 7, 11, 13, 17, 24, 34 y 40 post estro de ovejas Rideau Arcott (Media ± error estándar).

Día	Tratamiento			
	1	2	3	4
7	12.3±2.6 <sup>a</sup>	11.5±1.5 <sup>a</sup>	15.4±2.2 <sup>a</sup>	14.5±2.5 <sup>a</sup>
11	12.9±1.7 <sup>a</sup>	17.9±2.8 <sup>a</sup>	16.9±3.0 <sup>a</sup>	22.1±3.8 <sup>a</sup>
13	15.4±2.2 <sup>a</sup>	19.8±2.6 <sup>a</sup>	16.4±3.4 <sup>a</sup>	23.7±2.9 <sup>a</sup>
17	13.5±1.9 <sup>b</sup>	20.6±2.0 <sup>a</sup>	19.7±3.9 <sup>a</sup>	21.4±4.0 <sup>a</sup>
24	12.1±3.6 <sup>b</sup>	12.5±2.7 <sup>b</sup>	16.7±2.7 <sup>ab</sup>	20.8±2.6 <sup>a</sup>
34	11.4±2.0 <sup>a</sup>	10.6±1.5 <sup>a</sup>	19.0±3.3 <sup>a</sup>	15.8±2.7 <sup>a</sup>
40	8.8±3.1 <sup>a</sup>	10.8±1.6 <sup>a</sup>	10.7±3.0 <sup>a</sup>	6.6±2.3 <sup>a</sup>

Literal diferente dentro de cada fila indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). T1: CIDR y PGF2 $\alpha$ ; T2: CIDR y PGF2 $\alpha$  + 2 CIDR; T3: CIDR, PGF2 $\alpha$  y eCG y T4: CIDR, PGF2 $\alpha$  y eCG + 2 CIDR.

#### 4.5.6 Identificación del gen *ISG15* y sus polimorfismos

En el presente estudio, el 95 % (38 de 40) de las ovejas mostró el fragmento amplificado de 571 pb del gen *ISG15* (Figura 14).

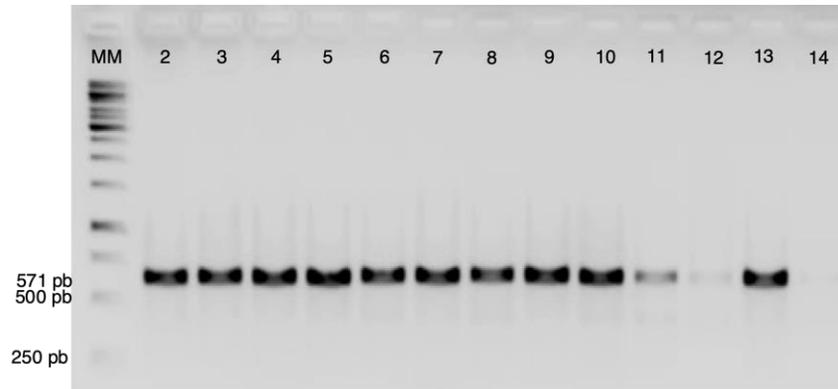


Figura 14. Amplificación del gen ISG15 en ovejas Rideau Arcott (571 pb). Carril 1: MM= marcador molecular, carriles 2-13 muestras amplificadas (571 pb) y carril 14: testigo negativo del gen ISG15.

De las 38 secuencias obtenidas, solo 32 tuvieron una calidad entre 90.2 y 97.9% y solo estas se utilizaron para el análisis. Las secuencias obtenidas en el presente estudio tuvieron una similitud de 97.4 y 99.7% con las secuencias de referencia FJ844480 y NM\_001009735, respectivamente (Yang *et al.*, 2018), para *ISG15*, provenientes de China. Por otro lado, el alineamiento de las 32 secuencias del *ISG15* de ovejas Rideau Arcott con la secuencia de referencia NM\_001009735, mostró la presencia de tres polimorfismos (Figura 15). Las tres mutaciones por transición encontradas fueron principalmente dos entre pirimidinas (T=C) en las posiciones (723 T>C) y (957; T>C) y una entre purinas (A=G) en la posición (857; A>G).

1. FJ844480_Ovis	G C A G T A C	1. FJ844480_Ovis	C A A A A G G	1. FJ844480_Ovis	G C A C T G T
2. NM_001009735	G C A G C A C	2. NM_001009735	C A A A G G G	2. NM_001009735	G C A C C G T
3. 1305_ISG15-R-1	G C A G T A C	3. 1305_ISG15-R-1	A A A A G G G	3. 1305_ISG15-R-1	G C A C T G T
4. 2202_ISG15-R-1	G C A G T A C	4. 2202_ISG15-R-1	A A A A G G G	4. 2202_ISG15-R-1	G C A C T G T
5. 5142_ISG15-R-1	G C A G C A C	5. 5142_ISG15-R-1	A A A G G G	5. 5142_ISG15-R-1	G C A C T G T
6. 10020_ISG15-R	G C A G C A C	6. 10020_ISG15-R	A A A A G G G	6. 10020_ISG15-R	G C A C C G T
7. 10025_ISG15-R	G C A G T A C	7. 10025_ISG15-R	A A A A G G G	7. 10025_ISG15-R	G C A C T G T
8. 10110_ISG15-R	G C A G T A C	8. 11086_ISG15-R	A A A A G G G	8. 11086_ISG15-R	G C A C T G T
9. 10111_ISG15-R	G C A G T A C	9. 11084_ISG15-R	A A A A G G G	9. 11084_ISG15-R	G C A C T G T
10. 11055_ISG15-F	G C A G C A C	10. 16008_ISG15-F	A A A G G G	10. 16008_ISG15-F	G C A C C G T
11. 11080_ISG15-F	G C A G C A C	11. 10110_ISG15-F	A A A A G G G	11. 10110_ISG15-F	G C A C T G T
12. 11084_ISG15-F	G C A G T A C	12. 10111_ISG15-F	A A A A G G G	12. 10111_ISG15-F	G C A C T G T
13. 11086_ISG15-F	G C A G C A C	13. 11055_ISG15-F	A A A A G G G	13. 11055_ISG15-F	G C A C T G T
14. 11166_ISG15-F	G C A G T A C	14. 11080_ISG15-F	A A A A G G G	14. 11080_ISG15-F	G C A C T G T
15. 12003_ISG15-F	G C A G T A C	15. 11166_ISG15-F	A A A A G G G	15. 11166_ISG15-F	G C A C T G T
16. 12010_ISG15-F	G C A G T A C	16. 12003_ISG15-F	A A A A G G G	16. 12003_ISG15-F	G C A C T G T
17. 12024_ISG15-F	G C A G C A C	17. 12010_ISG15-F	A A A A G G G	17. 12010_ISG15-F	G C A C T G T
18. 13085_ISG15-F	G C A G T A C	18. 12024_ISG15-F	A A A A G G G	18. 12024_ISG15-F	G C A C T G T
19. 13094_ISG15-F	G C A G T A C	19. 13085_ISG15-F	A A A A G G G	19. 13085_ISG15-F	G C A C T G T
20. 13097_ISG15-F	G C A G T A C	20. 13094_ISG15-F	A A A A G G G	20. 13094_ISG15-F	G C A C T G T
21. 14067_ISG15-F	G C A G T A C	21. 13097_ISG15-F	A A A A G G G	21. 13097_ISG15-F	G C A C T G T
22. 14080_ISG15-F	G C A G T A C	22. 14067_ISG15-F	A A A A G G G	22. 14067_ISG15-F	G C A C T G T
23. 14088_ISG15-F	G C A G C A C	23. 14080_ISG15-F	A A A A G G G	23. 14080_ISG15-F	G C A C T G T

Figura 15. Polimorfismos del gen ISG15 en las posiciones 723 (en la tercera posición del codón); 857 (en la segunda posición del codón) y 957 (en la tercera posición del codón) en ovejas Rideau Arcott.

Los polimorfismos de las posiciones 723 y 957 son mutaciones sinónimas o silenciosas; es decir, no producen un cambio de aminoácido en la proteína. En cambio, el polimorfismo de la posición 857 si produce una mutación no sinónima o cambio de aminoácido, una lisina (K) por una arginina (R; Figura 16) en la posición 114 de la proteína.

1. FJ844480_Ovis_	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
2. NM_001009735_	K	Q	Q	V	C	Q	R	E	R
3. 1305_ISG15-R-1	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
4. 2202_ISG15-R-1	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
5. 5142_ISG15-R-1	K	Q	Q	V	C	Q	R	E	R
6. 10020_ISG15-R-	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
7. 10025_ISG15-R-	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
8. 11086_ISG15-R-	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
9. 11084_ISG15-R-	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
10. 16008_ISG15-F	K	Q	Q	V	C	Q	R	E	R
11. 10110_ISG15-F	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
12. 10111_ISG15-F	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
13. 11055_ISG15-F	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
14. 11080_ISG15-F	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
15. 11166_ISG15-F	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
16. 12003_ISG15-F	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
17. 12010_ISG15-F	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
18. 12024_ISG15-F	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
19. 13085_ISG15-F	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
20. 13094_ISG15-F	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
21. 13097_ISG15-F	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
22. 14067_ISG15-F	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R
23. 14080_ISG15-F	K	Q	Q	V	C	Q	K	E	R

Figura 16. El polimorfismo del gen ISG15 con cambio en la posición (857; A>G) en ovejas Rideau Arcott. Posición (857; A>G) = lisina por arginina (K→R).

#### 4.5.7 Análisis de polimorfismos en el gen *ISG15*

El análisis de polimorfismos mediante la prueba de Tajima D evidenció que dichos SNP encontrados son mutaciones deletéreas. El valor de  $\pi$  con respecto a  $\Theta$  indica que la selección ha contribuido para que se presenten un mayor número de alelos deletéreas en la muestra (Cuadro 12).

Cuadro 12. Prueba de Tajima (D) del gen ISG15.

Numero de secuencias	S	Sc	Sv	Ps	$\Theta$	$\pi$	D
31	3	417	3	0.007143	0.001788	0.001720	-0.088061

S: sitios segregantes; Sc: sitios conservados; Sv= sitios variables; Ps: sitios segregantes entre el número total de sitios;  $\Theta$ = cuatro por el tamaño efectivo poblacional por la tasa de mutación;  $\pi$ = diversidad nucleotídica; D: estadístico de Tajima.

#### 4.6 DISCUSIÓN

Desde 1960 se ha realizado investigación enfocada para optimizar los programas de sincronización del estro, esfuerzo que continúa hasta el día de hoy (Xu, 2016). Uno de los protocolos más efectivos de sincronización del estro en ovejas, involucra el uso de dispositivos intravaginales impregnados con progesterona o sus análogos en combinación con gonadotropina coriónica equina y con prostaglandinas F2 $\alpha$  (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2020). En el presente estudio se utilizó este método y los resultados obtenidos coinciden con lo encontrado por Letelier *et al.* (2011), quienes reportaron que todas las ovejas presentaron estro, al usar un análogo de progesterona por 14 días para sincronizar ovejas de la raza manchega en España. En este estudio, la presincronización con PGF2 $\alpha$  sirvió para homogenizar la respuesta ovárica al protocolo de sincronización, lo cual aseguró que la mayoría de las hembras manifestaran estro.

El tiempo de inicio al estro del grupo T1 (32.4 h) es similar a lo reportado por Yaprak y Korkmaz (2016) en el estudio que realizaron para evaluar el desempeño reproductivo de ovejas Morkaraman inducidas al estro con progesterona natural y sintética, con un tiempo reportado de 39.53 h. El tiempo de inicio al estro de las ovejas del T4 (14.4h) fue menor a lo reportado por Hashem *et al.* (2015), quienes reportaron el inicio al estro de ovejas Barki x Rahmani inducidas al estro con GnRH (34.0 h) y con PGF2 $\alpha$  (50.4 h). El tiempo de inicio al estro de las ovejas en T2 (29.2 h) es similar a lo que reportan Nakafeero *et al.* (2020) en donde indujeron al estro ovejas de la raza Merino Mutton Sudafricanas con CIDR por 9 días (30.8 h). La administración de eCG entre 24-48 h antes del retiro del dispositivo liberador de progesterona adelanta el inicio del estro en relación al retiro (Quintero-Elisea *et al.*, 2011); esto concuerda con los resultados encontrados en el presente estudio. El efecto concreto de esta glicoproteína se puede imputar al incremento de la esteroidogénesis en las células de la teca de los folículos dominantes y ovulatorios, lo cual contribuye a un mejor desarrollo folicular (De Rensis y López-Gatius, 2014). Esto podría explicar el inicio al estro más rápido en los tratamientos a los que se les aplicó eCG.

El retorno a estro en ovejas puede atribuirse a un menor número de ovulaciones por oveja y, por lo tanto, posteriormente a niveles bajos de progesterona circulante (Luther *et al.*, 2007). En el presente estudio hay una menor tasa de retorno a estro en las ovejas de los T3 y T4; esto puede deberse a que se aplicó una dosis de eCG en estas ovejas, lo cual favoreció el crecimiento y desarrollo folicular y propició la formación de un cuerpo lúteo de buena calidad (Dias *et al.*, 2009). Sin embargo, algunos estudios han reportado que las hembras incluidas recurrentemente en protocolos para la sincronización del estro

a lo largo de su vida reproductiva, sobre todo aquellas involucradas en sistemas intensivos, desarrollan anticuerpos anti-eCG que se asocian con bajas tasas de gestación (Palacín *et al.*, 2012). Estos factores intrínsecos a los animales podrían explicar aquellas tasas de retorno a estro obtenidas en el presente estudio.

La tasa de gestación reportada por Fierro y Olivera-Muzante (2017) en ovejas de la raza Corriedale (66.2%), a las que se les sincronizó el estro con acetato de medroxiprogesterona y eCG, fue similar a la tasa de gestación reportada en los grupos T2 y T3 (60 y 70%, respectivamente) de este estudio. En cambio, en las condiciones experimentales del presente estudio, la administración de eCG en los T3 y T4 no favoreció la tasa de gestación ni la parición. Actualmente en los estudios de dinámica folicular, se ha encontrado que bajas tasas de gestación en protocolos de sincronización están asociadas al desarrollo de folículos dominantes persistentes, esto se debe a que las dosis de progestágenos administradas en estos protocolos son inútiles para eliminar el desarrollo de folículos dominantes persistentes (Xu, 2016). Los ovocitos provenientes de folículos dominantes persistentes pueden no ser fertilizados y además se convierten en cuerpos lúteos de mala calidad y en el caso de ser fertilizados se convierten en embriones de mala calidad que no pueden producir una señal adecuada para mantener la gestación (Vargas *et al.*, 2009), esto podría explicar las bajas tasas de gestación reportadas en el presente estudio.

La prolificidad de los cuatro tratamientos T1, T2, T3 y T4 fue similar estadísticamente en las condiciones del presente estudio. Estos datos coinciden con el estudio de Shrestha y Heaney (2003) quienes reportaron un valor de 1.7 de prolificidad con corderas canadienses de la raza Rideau Arcott, pero un valor de 2.5 en ovejas adultas. En el caso

de los grupos T3 y T4, la aplicación de eCG no favoreció la variable prolificidad, ya que se ha reportado que el objetivo de la aplicación de eCG en programas de sincronización con progestágenos es aumentar las ovulaciones múltiples y, en consecuencia, una mayor cantidad de partos múltiples (Quintero-Elisea *et al.*, 2011). Y para prevenir una regresión lútea prematura se suplementa progesterona, tal como se realizó en los grupos T2 y T4 del presente estudio. La P4 que inhibe los receptores de oxitocina en el endometrio y reduce así la respuesta uterina a la oxitocina para la secreción de PGF2 $\alpha$  (Kaya *et al.*, 2013). Vilariño *et al.* (2017) reportaron ningún efecto de la eCG en la tasa de prolificidad en donde evaluaron un protocolo corto basado en progesterona en ovejas Corriedale. Por su parte, Hasani *et al.* (2018) obtuvieron resultados similares de prolificidad a los del presente estudio en ovejas Ghezel. Mientras tanto, Shrestha y Heaney (2003) mencionan en su estudio que las ovejas de la raza Rideau Arcott tienen una prolificidad superior a otras razas. Es recomendable que cada técnico evalúe la aplicación de hormonas que incrementen la prolificidad, debido a que esto podría propiciar un incremento en la mortalidad, si el parto no se monitorea diligentemente (Cueto *et al.*, 2020).

En cuanto a fecundidad el resultado encontrado en el grupo T4 (1.87) es superior a la fecundidad obtenida por Hernández-Marín *et al.* (2018) en ovejas Pelibuey con efecto macho (0.8) y similar a las ovejas con efecto macho y destete temporal (1.6). Una de las funciones de la eCG en los protocolos de sincronización de estros es incrementar la tasa ovulatoria y, por lo tanto, la fecundidad de las ovejas tratadas, aunque los resultados dependen de la dosis aplicada y además existe una gran variabilidad en la respuesta que

puede estar asociada con la raza, la edad, la época del año y la condición general del animal (Boscos *et al.*, 2002).

Al día 17 post estro inducido, se encontró un menor nivel de progesterona en el grupo T1 con respecto a los grupos T2, T3 y T4 ( $p < 0.05$ ). La diferencia en el nivel de progesterona posiblemente puede deberse a que a las ovejas del T1 no se les aplicó eCG vía exógena y tampoco tuvieron suplemento de progesterona. Y en el día 24 post estro, se encontró un mayor nivel de progesterona en el grupo T4 en comparación con los tratamientos T1, T2 y T3 ( $p < 0.05$ ). Esto puede deberse a que las ovejas del grupo T4 tuvieron suplemento de progesterona y además se les aplicó eCG. La aplicación de eCG inicia un estímulo para la liberación de gonadotropinas y puede proporcionar un soporte gonadotrófico adecuado para el desarrollo de folículos ovulatorios que posteriormente se convertirán en CL (Ferraz *et al.*, 2019). La administración de eCG a las ovejas beneficia el desarrollo de CL y ayuda a aumentar la secreción de progesterona. Este efecto previene las pérdidas embrionarias tempranas (Fukui *et al.*, 2001). Esto podría explicar las diferencias en los niveles séricos de progesterona encontradas en el presente estudio. Por su parte, Hasani *et al.* (2018) reportaron  $11 \text{ ng mL}^{-1}$  en las concentraciones plasmáticas de progesterona en ovejas Ghezel, 20 días después de haber retirado el progestágeno. Este resultado es similar a lo encontrado en el presente estudio al día 24 en las ovejas del T1 ( $12.14 \text{ ng mL}^{-1}$ ) presincronizadas con  $\text{PGF2}\alpha$  y sincronizadas con CIDR exclusivamente, las cuáles no recibieron ni eCG ni adición de progesterona vía exógena. La adición de progesterona en los T2 y T4 no mejoró la variable fecundidad y esto posiblemente fue debido a que las ovejas de la raza Rideau Arcott son naturalmente prolíficas.

Referente a la identificación del gen *ISG15*, se amplificó el fragmento de 571 pb en el 95% (38 de 40) de las ovejas utilizadas en el presente estudio. De estas 38 ovejas, de las cuales se obtuvo un amplicon para mandar a secuenciar, solo el 84% (32) de las secuencias obtenidas tuvieron una calidad mayor a 90.2%. Se identificaron tres polimorfismos correspondientes a tres transiciones. El primer polimorfismo o mutación sinónima (201 T>C) se identificó en el 62% (20 de 32) de las secuencias viables. En este caso el polimorfismo identificado no provoca un cambio de aminoácido en la proteína. Las investigaciones recientes demuestran que las mutaciones sinónimas pueden intervenir en el procesado, plegamiento o incluso la traducción del ARN. También se ha demostrado que las mutaciones sinónimas juegan un papel importante en algunas enfermedades y son relevantes en la práctica clínica (Sharma *et al.*, 2019). El segundo polimorfismo o mutación no sinónima (335; A>G) el cual provocó un cambio en el aminoácido, una lisina (K) por una arginina (R), solo se identificó en el 6% (2 de 32) de las secuencias u ovejas. Y el tercer polimorfismo o mutación sinónima (437; T>C) se presentó en un 6% (2 de 32) de las ovejas de la raza Rideau Arcott. El estadístico de Tajima D fue negativo, lo que indica que los SNP encontrados no son neutrales y que las ovejas del presente estudio están bajo un proceso de selección negativa. Se requiere realizar más investigación para determinar si los polimorfismos encontrados en las ovejas de la Rideau Arcott del presente estudio tienen alguna implicación en el proceso del reconocimiento materno de la gestación o en algún otro proceso.

## 4.7 CONCLUSIONES

La aplicación de eCG en ovejas de la raza Rideau Arcott indujo el inicio del estro de forma rápida, pero no influyó en la manifestación al estro, retorno al estro, prolificidad ni fecundidad. El estro de las ovejas de la raza Rideau Arcott se sincronizó con éxito con los protocolos utilizados en este estudio, pero la suplementación de progesterona con dos dispositivos CIDR® no mejoró los porcentajes de gestación y parición, ni las tasas de prolificidad y fecundidad en ovejas de la raza Rideau Arcott. Se identificaron tres polimorfismos de nucleótido simple por transición en el *gen ISG15* de ovejas de la raza Rideau Arcott; dos mutaciones sinónimas o silenciosas entre pirimidinas (T=C) en las posiciones (723 T>C) y (957; T>C) y una mutación no sinónima entre purinas (A=G) en la posición (857; A>G), la cual modificó el aminoácido, una lisina (K) por una arginina (R). Se requiere realizar más investigación para determinar si estas mutaciones están involucradas en alguna función en el reconocimiento materno de la gestación de la oveja.

#### 4.8 LITERATURA CITADA

- Abdoli, R., Zamani, P., Mirhoseini, S., Ghavi Hossein-Zadeh, N., & Nadri, S. (2016). A review on prolificacy genes in sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(5), 631–637. <https://doi.org/10.1111/rda.12733>
- Abecia, J. A., Forcada, F., & González-Bulnes, A. (2011). Pharmaceutical Control of Reproduction in Sheep and Goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27(1), 67–79. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.10.001>
- Alak, I., Hitit, M., Kose, M., Kaya, M. S., Ucar, E. H., Atli, Z., & Atli, M. O. (2020). Relative abundance and localization of interferon-stimulated gene 15 mRNA transcript in intra- and extra-uterine tissues during the early stages of pregnancy in sheep. *Animal Reproduction Science*, 216, 106347. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106347>
- Bairagi, S., Grazul-Bilska, A. T., Borowicz, P. P., Reyaz, A., Valkov, V., & Reynolds, L. P. (2018). Placental development during early pregnancy in sheep: Progesterone and estrogen receptor protein expression. *Theriogenology*, 114, 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.002>
- Boscós, C. M., Samartzi, F. C., Dellis, S., Rogge, A., Stefanakis, A., & Krambovitis, E. (2002). Use of progestagen–gonadotrophin treatments in estrus synchronization of sheep. *Theriogenology*, 58(7), 1261–1272. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01040-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01040-3)
- Bragança, G. M., Batista, R. I. T. P., Souza-Fabjan, J. M. G., Alfradique, V. A. P., Arashiro, E. K. N., Pinto, P. H. N., Santos, J. D. R., Camargo, L. S. A., Menchaca, A., da Fonseca, J. F., & Brandão, F. Z. (2021). Exogenous progestogens differentially alter gene expression of immature cumulus–oocyte complexes in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*, 74, 106518. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106518>
- Coffman, E. A., & Pinto, C. R. (2016). A Review on the Use of Prostaglandin F2 $\alpha$  for Controlling the Estrous Cycle in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 40, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.01.008>
- Cueto, M. I., Bruno-Galarraga, M. M., Fernandez, J., Fierro, S., & Gibbons, A. E. (2020). Addition of eCG to a 14 d prostaglandin treatment regimen in sheep FTAI programs. *Animal Reproduction Science*, 221, 106597. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106597>
- Dash, H. R., Shrivastava, P., & Das, S. (2020a). Collection, Transportation, and Preservation of Biological Evidences for DNA Analysis. En H. R. Dash, P. Shrivastava, & S. Das, *Principles and Practices of DNA Analysis: A Laboratory Manual for Forensic DNA Typing* (pp. 21–27). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0274-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0274-4_3)

- Dash, H. R., Shrivastava, P., & Das, S. (2020b). Principles and Practices of DNA Analysis: A Laboratory Manual for Forensic DNA Typing. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0274-4>
- De Rensis, F., & López-Gatiús, F. (2014). Use of Equine Chorionic Gonadotropin to Control Reproduction of the Dairy Cow: A Review. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(2), 177–182. <https://doi.org/10.1111/rda.12268>
- Dias, C. C., Wechsler, F. S., Day, M. L., & Vasconcelos, J. L. M. (2009). Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F<sub>2α</sub> treatment affect fertility in postpubertal Nelore heifers. *Theriogenology*, 72(3), 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.03.006>
- Dias, J. H., Miranda, V. O., Oliveira, F. C., Vargas, S. F., Haas, C. S., Costa, V. G. G., Lucia, T., Vieira, A. D., Corcini, C. D., & Gasperin, B. G. (2020). Treatment with eCG and hCG to induce onset of estrous cycles in ewes during the non-breeding season: Effects on follicular development and fertility. *Animal Reproduction Science*, 212, 106232. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106232>
- Dzimianski, J. V., Scholte, F. E. M., Bergeron, É., & Pegan, S. D. (2019). ISG15: It's Complicated. *Journal of Molecular Biology*, 431(21), 4203–4216. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.013>
- Ealy, A. D., & Seekford, Z. K. (2019). Symposium review: Predicting pregnancy loss in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 11798–11804. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17176>
- Farias Machado, N. A., Filho, J. A. D. B., de Oliveira, K. P. L., Parente, M. de O. M., de Siqueira, J. C., Pereira, A. M., Santos, A. R. D., Sousa, J. M. S., Rocha, K. S., Viveiros, K. K. de S., & Costa, C. dos S. (2020). Biological rhythm of goats and sheep in response to heat stress. *Biological Rhythm Research*, 51(7), 1044–1052. <https://doi.org/10.1080/09291016.2019.1573459>
- Fernandez, J., Bruno-Galarraga, M. M., Soto, A. T., de la Sota, R. L., Cueto, M. I., Lacau-Mengido, I. M., & Gibbons, A. E. (2019). Effect of GnRH or hCG administration on Day 4 post insemination on reproductive performance in Merino sheep of North Patagonia. *Theriogenology*, 126, 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.008>
- Ferraz, P. A., Silva, M. A. A., Carôso, B. S. S., Araujo, E. A. B., Bittencourt, T. C. B. S. C., Chalhoub, M., Bittencourt, R. F., & Ribeiro Filho, A. L. (2019). Effect of eCG on the follicular dynamics and vascularization of crossbred cows with different circulating progesterone concentrations during synchronization of ovulation in an FTAI protocol. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 39(5), 324–331. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5520>

- Fierro, S., & Olivera-Muzante, J. (2017). Long interval prostaglandin as an alternative to progesterone-eCG based protocols for timed AI in sheep. *Animal Reproduction Science*, 180, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.03.004>
- Fukui, Y., Itagaki, R., Ishida, N., & Okada, M. (2001). Effect of Different hCG Treatments on Fertility of Estrus-Induced and Artificially Inseminated Ewes During the Non-Breeding Season. *Journal of Reproduction and Development*, 47(4), 189–195. <https://doi.org/10.1262/jrd.47.189>
- Gholizadeh, M., Rahimi-Mianji, G., & Nejati-Javaremi, A. (2015). Genomewide association study of body weight traits in Baluchi sheep. *Journal of Genetics*, 94(1), 143–146. <https://doi.org/10.1007/s12041-015-0469-1>
- Gonzalez-Bulnes, A., Menchaca, A., Martin, G. B., & 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), 441. <https://doi.org/10.1071/RD18477>
- Haq, I. U., Han, Y., Ali, T., Wang, Y., Gao, H., Lin, L., Wu, Y., Wu, S., & Zeng, S. (2016). Expression of interferon-stimulated gene ISG15 and ubiquitination enzymes is upregulated in peripheral blood monocyte during early pregnancy in dairy cattle. *Reproductive Biology*, 16(4), 255–260. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2016.10.001>
- Hasani, N., Ebrahimi, M., Ghasemi-Panahi, B., & HosseinKhani, A. (2018). Evaluating reproductive performance of three estrus synchronization protocols in Ghezel ewes. *Theriogenology*, 122, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.07.005>
- Hashem, N. M., El-Zarkouny, S. Z., Taha, T. A., & Abo-Elezz, Z. R. (2015). Oestrous response and characterization of the ovulatory wave following oestrous synchronization using PGF2 $\alpha$  alone or combined with GnRH in ewes. *Small Ruminant Research*, 129, 84–87. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.06.003>
- Hernández-Marín, J. A., Cortez-Romero, C., Corredor, C., Pérez-Hernández, P., Pro-Martínez, A., & Sánchez, J. (2018). “Male effect” and “temporary weaning” in synchronization of post-partum ovarian activity in Pelibuey ewes. *South African Journal Of Animal Science*, 48, 743–750. <https://doi.org/10.4314/sajas.v48i4.16>
- Kaya, S., Kaçar, C., Kaya, D., & Aslan, S. (2013). The effectiveness of supplemental administration of progesterone with GnRH, hCG and PGF2 $\alpha$  on the fertility of Tuj sheep during the non-breeding season. *Small Ruminant Research*, 113(2–3), 365–370. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.03.018>
- Kuang, Y., Chen, Q., Fu, Y., Wang, Y., Hong, Q., Lyu, Q., Ai, A., & Shoham, Z. (2015). Medroxyprogesterone acetate is an effective oral alternative for preventing premature luteinizing hormone surges in women undergoing controlled ovarian

- hyperstimulation for in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 104(1), 62-70.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.03.022>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Letelier, C. A., Contreras-Solis, I., García-Fernández, R. A., Sánchez, M. A., García-Palencia, P., Sánchez, B., Ariznavarreta, C., Tresguerres, J. A. F., Flores, J. M., & Gonzalez-Bulnes, A. (2011). Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep. *Animal Reproduction Science*, 126(1–2), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.04.012>
- Lonergan, P., & Sánchez, J. M. (2020). Symposium review: Progesterone effects on early embryo development in cattle. *Journal of Dairy Science*, 103(9), 8698–8707. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18583>
- Luther, J. S., Grazul-Bilska, A. T., Kirsch, J. D., Weigl, R. M., Kraft, K. C., Navanukraw, C., Pant, D., Reynolds, L. P., & Redmer, D. A. (2007). The effect of GnRH, eCG and progestin type on estrous synchronization following laparoscopic AI in ewes. *Small Ruminant Research*, 72(2–3), 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.10.015>
- Mahdavi, M., Nanekarani, S., & Hosseini, S. D. (2014). Mutation in BMPR-IB gene is associated with litter size in Iranian Kalehkoohi sheep. *Animal Reproduction Science*, 147(3–4), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.04.003>
- Murphy, B. D., & Martinuk, S. D. (1991). Equine Chorionic Gonadotropin. *Endocrine Reviews*, 12(1), 27–44. <https://doi.org/10.1210/edrv-12-1-27>
- Nakafeero, A., Hassen, A., & Lehloenya, K. C. (2020). Investigation of ram effect and eCG usage in progesterone based oestrous synchronization protocols on fertility of ewes following fixed time artificial insemination. *Small Ruminant Research*, 183, 106034. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.106034>
- Padmanabhan, V., & Cardoso, R. C. (2020). Neuroendocrine, autocrine, and paracrine control of follicle-stimulating hormone secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 500, 110632. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110632>
- Palacín, I., Yániz, J. L., Fantova, E., Blasco, M. E., Quintín-Casorrán, F. J., Sevilla-Mur, E., & Santolaria, P. (2012). Factors affecting fertility after cervical insemination with cooled semen in meat sheep. *Animal Reproduction Science*, 132(3-4), 139-144. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.05.005>
- Quintero-Elisea, J. A., Macías-Cruz, U., Álvarez-Valenzuela, F. D., Correa-Calderón, A., González-Reyna, A., Lucero-Magaña, F. A., Soto-Navarro, S. A., & Avendaño-Reyes, L. (2011). The effects of time and dose of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) on reproductive efficiency in hair sheep ewes. *Tropical*

Animal Health and Production, 43(8), 1567–1573.  
<https://doi.org/10.1007/s11250-011-9843-z>

Segerkvist, K. A., Höglund, J., Österlund, H., Wik, C., Högberg, N., & Hessle, A. (2020). Automatic weighing as an animal health monitoring tool on pasture. *Livestock Science*, 240, 104157. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104157>

Sharma, Y., Miladi, M., Dukare, S., Boulay, K., Caudron-Herger, M., Groß, M., Backofen, R., & Diederichs, S. (2019). A pan-cancer analysis of synonymous mutations. *Nature Communications*, 10(1), 2569. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10489-2>

Shrestha, J. N. B., & Heaney, D. P. (2003). Review of Canadian, Outaouais and Rideau Arcott breeds of sheep. *Small Ruminant Research*, 49(1), 79–96. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00070-1](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00070-1)

Spencer, T. E., Forde, N., & Lonergan, P. (2016). The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5941–5950. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10070>

Swelum, A. A.-A., Saadeldin, I. M., Moumen, A. F., Ali, M. A., & 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, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.07.018>

Tajima, F. (1989). Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595.

The International Sheep Genomics Consortium, Archibald, A. L., Cockett, N. E., Dalrymple, B. P., Faraut, T., Kijas, J. W., Maddox, J. F., McEwan, J. C., Hutton Oddy, V., Raadsma, H. W., Wade, C., Wang, J., Wang, W., & Xun, X. (2010). The sheep genome reference sequence: A work in progress: The sheep genome reference sequence: a work in progress. *Animal Genetics*, 41(5), 449–453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02100.x>

Thompson, J. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876–4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>

Vargas, A. J., Bernardi, M. L., Bortolozzo, F. P., Mellagi, A. P. G., & Wentz, I. (2009). Factors associated with return to estrus in first service swine females. *Preventive Veterinary Medicine*, 89(1–2), 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.02.001>

Vilariño, M., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P. C., García-Pintos, C., & Menchaca, A. (2017). Time of ovulation and pregnancy outcomes obtained with the

prostaglandin-based protocol Synchrovine for FTAI in sheep. *Theriogenology*, 90, 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.003>

Xu, Z. Z. (2016). Control of Estrus Cycles: Synchronization of Estrus. En Reference Module in Food Science (p. B9780081005965010000). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.01037-4>

Yang, L., Liu, Y., Lv, W., Wang, P., Wang, B., Xue, J., & Zhang, L. (2018). Expression of interferon-stimulated gene 15-kDa protein, cyclooxygenase (COX) 1, COX-2, aldo-keto reductase family 1, member B1, and prostaglandin E synthase in the spleen during early pregnancy in sheep. *Animal Science Journal*, 89(11), 1540–1548. <https://doi.org/10.1111/asj.13101>

Yaprak, M., & Korkmaz, M. K. (2016). Effect of different oestrus synchronization methods on reproductive performance of Morkaraman (Redkaraman) sheep in laparoscopic artificial insemination program. *Journal of Biotechnology*, 231, S21. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.05.097>

## CONCLUSIONES GENERALES

Los indicadores bibliométricos permitieron identificar las características de la producción científica de documentos publicados en revistas indizadas en el Science Citation Index Expanded (SCIE) y el análisis de co-palabras mostró que la progesterona y los genes Interferón tau (*TP-1*) y el estimulado por el interferón 15 (*ISG15*) están altamente implicados en el inicio de la gestación en las ovejas.

La presincronización con  $PGF2\alpha$  favoreció la respuesta al estro de las ovejas en el presente estudio. La adición de eCG en los protocolos de sincronización del estro influyó en el inicio del estro de las ovejas de pelo y Rideau Arcott. La suplementación de progesterona durante el periodo de reconocimiento materno de la gestación no mejoró la tasa de gestación en ovejas de pelo y Rideau Arcott, pero se recomienda realizar más investigaciones de este tipo con un mayor número de ovejas por tratamiento.

Se amplificaron los genes *TP-1* e *ISG15*. y se identificaron tres polimorfismos de nucleótido simple por transición en el *gen ISG15* de ovejas de la raza Rideau Arcott y cuatro polimorfismos de nucleótido simple en el *gen TP-1* de ovejas de pelo. Se recomienda realizar más investigación para determinar si estas mutaciones están implicadas en alguna función durante el reconocimiento materno de la gestación.