

## Caracterización del pico preovulatorio de LH en ovejas Rasa Aragonesa portadoras o no del alelo *FecX<sup>R</sup>* (ROA<sup>®</sup>)

B. Lahoz\*, J. Folch, P. Sánchez y J.L. Alabart

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) de Aragón, 50059 Zaragoza, España

### Resumen

La presencia del alelo *FecX<sup>R</sup>* en heterocigosis produce un incremento de la tasa de ovulación y prolificidad, así como una mayor respuesta a la eCG. Sin embargo, todavía se desconocen sus posibles efectos sobre la descarga preovulatoria de LH, lo cual es esencial para realizar la inseminación artificial en el momento óptimo. Con este objetivo, se extrajeron muestras sanguíneas a intervalos de 4-6 horas durante las 72 horas siguientes a la retirada de una esponja (FGA, 30 mg), de 50 ovejas adultas agrupadas en 5 lotes en función de su genotipo (R+ y ++; portadoras y no portadoras) y tratamiento hormonal (sin eCG, 240 ó 480 UI). Las concentraciones de LH se analizaron mediante un kit comercial ELISA. No se observó ninguna diferencia significativa en el pico preovulatorio de LH entre ovejas R+ y ++. La eCG adelantó la descarga preovulatoria de LH en ambos genotipos, sin diferencias entre ovejas R+ tratadas con 240 ó 480 UI. Estos resultados demuestran que la presencia de *FecX<sup>R</sup>* no afecta al pico preovulatorio de LH, independientemente de la dosis utilizada. Por lo tanto, la dosis de eCG que se aplique a las ovejas R+ estará en función de las necesidades y posibilidades de la explotación para asumir una mayor prolificidad y multiplicidad de partos. En las ovejas ++ tratadas con eCG se recomienda seguir inseminando a las  $54 \pm 1$  horas de retirar las esponjas, como se hace habitualmente, ya que se observó una buena sincronización del pico preovulatorio de LH a las 37 horas.

**Palabras clave:** BMP15, eCG, inseminación artificial, ovulación, PMSG, prolificidad.

### Abstract

#### Preovulatory LH surge of Rasa Aragonesa ewes carrying or not the *FecX<sup>R</sup>* allele (ROA<sup>®</sup>)

The presence of the *FecX<sup>R</sup>* allele in heterozygosity (R+) increases ovulation rate and prolificacy in Rasa Aragonesa ewes, and leads to a greater response to eCG. However, their potential effects on preovulatory LH surge are still unknown, which is essential to establish the optimum time for artificial insemination. With this aim, blood samples were taken at 4-6 hours intervals during 72 hours after the removal of a 30 mg FGA sponge, from 50 adult ewes divided in 5 groups depending on their genotype (R+ and ++; carriers and non-carriers) and hormonal treatment (without eCG, 240 or 480 IU). The LH concentrations were analyzed using a commercial ELISA kit. There was no significant difference on the time of the preovulatory LH surge between R+ and ++ ewes. Treatment with eCG significantly advanced the preovulatory LH discharge in both genotypes, with no difference between R+ ewes treated with 240 or 480 IU. These results demonstrate that the presence of the *FecX<sup>R</sup>* allele did not affect the preovulatory LH surge, regardless of eCG dose. Therefore, the dose of eCG that should be applied to R+ ewes could be a decision of the farmer depending on the needs and possibilities of the farm to manage

---

\* Autor para correspondencia: [blahozc@aragon.es](mailto:blahozc@aragon.es)

DOI: pendiente

greater prolificacy and multiple births. In ++ ewes treated with eCG it is recommended to continue with the established protocol and inseminate  $54 \pm 1$  hours after sponge withdrawal, as it is usually done, since a good synchronization of the preovulatory LH peak was observed at 37 hours.

**Key words:** Artificial insemination, BMP15, eCG, ovulation, PMSG, prolificacy.

## Introducción

La Rasa Aragonesa es una raza autóctona mediterránea principalmente explotada en sistemas semi-extensivos orientados a la producción de cordero ligero. En las condiciones estructurales de Aragón, los resultados reproductivos son de vital importancia para la rentabilidad y viabilidad de estas explotaciones, siendo esencial el número de corderos vendidos por oveja (Pardos *et al.*, 2008). Por ello, desde el año 1994, se está llevando a cabo un programa de selección por prolificidad en las ganaderías de esta raza. En 2007, se observó que determinados animales del programa presentaban una prolificidad muy elevada que no se correspondía con la esperada por una herencia poligénica clásica, lo que dio lugar al descubrimiento de un nuevo polimorfismo en el gen *BMP15* (alelo *FecX<sup>R</sup>*), localizado en el cromosoma X, que produce un aumento de la prolificidad en portadoras heterocigotas (R+) y esterilidad en homocigotas (RR; Martínez-Royo *et al.*, 2008). Este aumento de la prolificidad de las ovejas R+ (+0,35 corderos/parto) se debe a un aumento de su tasa de ovulación (+0,63 cuerpos lúteos/oveja; Lahoz *et al.*, 2011). Dichas ventajas productivas han suscitado un creciente interés en las ganaderías por la introducción de esta variante génica, explotándose con el nombre comercial de ROA® (Rasa Oviaragón), cuyas ventajas económicas han sido recientemente cuantificadas (Pardos *et al.*, 2010).

La Rasa Aragonesa es una raza con un anestro estacional moderado, presentando celos entre un 20 y 40% de las ovejas entre finales de invierno y principios de verano, siendo algo mayor el porcentaje de animales cíclicos

determinado por progesterona (Sierra, 1969; Alonso de Miguel, 1979; Forcada *et al.*, 1992; Folch *et al.*, 1999). Como consecuencia, la producción de corderos y sus precios sufren fluctuaciones a lo largo del año, traduciéndose en menores precios en el primer semestre del año y mayores en el segundo. El porcentaje de corderos vendidos en el segundo semestre ha demostrado ser uno de los factores que más inciden en el balance económico de las explotaciones (Pardos *et al.*, 2008; Fantova *et al.*, 2011). Para mejorar la fertilidad y prolificidad durante la época de anestro estacional, así como para la utilización de la inseminación artificial (IA) a tiempo fijo durante todo el año dentro del programa de mejora genética, el uso de tratamientos hormonales, principalmente de esponjas intravaginales y eCG, es una práctica habitual en las ganaderías.

Se sabe que la aplicación de la dosis habitual de eCG (480 UI) a las ovejas portadoras de la mutación en heterocigosis produce un importante aumento en la tasa de ovulación que conlleva un aumento importante en los partos triples o de orden superior. Por el contrario, se ha demostrado que aplicando 240 UI a ovejas R+ se obtiene una tasa de ovulación similar a cuando se aplica 480 UI a ovejas no portadoras (++) , lo que debe tenerse en cuenta por parte del ganadero en relación a su capacidad de gestión de los partos múltiples (Lahoz *et al.*, 2011). Sin embargo, se desconocen los posibles efectos que puedan tener tanto el genotipo como la utilización de diferentes dosis de eCG sobre la aparición y agrupación de celos y, por tanto, si debe modificarse el momento de aplicar la IA. Según Jabbour y Evans (1991), la causa más común de fallo de la IA sería la asincronía entre la IA

y la ovulación. Es por tanto necesario estudiar si la presencia del alelo *FecX<sup>R</sup>* afecta al momento y concentración de las ovulaciones, lo cual constituye el objetivo del presente trabajo. Para ello, se determinó la aparición del pico preovulatorio de LH en ovejas portadoras heterocigotas y no portadoras, tratadas o no con dos dosis diferentes de eCG.

### Material y métodos

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a las recomendaciones de la Unión Europea (2003/65/CE) y normativa española (RD 1201/2005, BOE 252/34367-91) para el uso y cuidado de animales en experimentación. El procedimiento fue aprobado por el comité de ética del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (Número de registro: CITA 2011-08).

### Animales y diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del CITA (Zaragoza, España) en noviembre de 2011 (estación sexual). Se utilizaron 50 ovejas adultas, multíparas y secas, con un intervalo al parto anterior superior a tres meses, de raza Rasa Aragonesa, siendo 30 de ellas portadoras heterocigotas del alelo *FecX<sup>R</sup>* (R+), y 20 ovejas no portadoras (++). Los animales estaban mantenidos en el mismo rebaño en idénticas condiciones de explotación. Previamente al inicio del experimento los animales se dividieron en 5 lotes similares en peso y condición corporal (Russel *et al.*, 1969), dependiendo del genotipo de *BMP15* y del tipo de tratamiento hormonal, tal y como se muestra en la tabla 1. Las diferencias en peso y condición corporal entre lotes no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 1. Características de los lotes experimentales: número de ovejas, genotipo, tratamiento hormonal, peso y condición corporal  
 Table 1. Characteristics of the experimental groups: number of ewes, genotype, hormonal treatment, weight and body condition score

Lote	Nº ovejas	Genotipo	Dosis eCG <sup>1</sup>	Peso (kg) <sup>2</sup>	CC <sup>2</sup>
Sin eCG					
++ 0	10	++	–	52,3 ± 2,4	2,9 ± 0,1
R+ 0	10	R+	–	58,3 ± 2,0	2,8 ± 0,1
Con eCG					
++ 480	10	++	480 UI	51,5 ± 1,9	2,9 ± 0,1
R+ 480	10	R+	480 UI	58,0 ± 3,1	2,9 ± 0,1
R+ 240	10	R+	240 UI	56,9 ± 1,7	2,7 ± 0,1

++: Ovejas de genotipo salvaje.

R+: Ovejas heterocigotas para el alelo *FecX<sup>R</sup>*.

<sup>1</sup> Sincropart® PMSG 6000 UI, CEVA Salud Animal SA (Barcelona, España). Todas las ovejas recibieron previamente una esponja de 30 mg de FGA (Sincropart® 30 mg; CEVA Salud Animal SA; Barcelona, España).

<sup>2</sup> medias ± error estándar.

CC: Condición corporal.

### Tratamiento hormonal

Se insertó a las 50 ovejas el mismo día una esponja vaginal de 30 mg de FGA (Sincropart® 30 mg; CEVA Salud Animal SA; Barcelona, España), que permaneció durante 14 días. En el momento de la retirada, 10 ovejas ++ y 10 ovejas R+ no recibieron ningún tratamiento hormonal (lotes “++0” y “R+0”, respectivamente). Las 30 ovejas restantes recibieron en ese mismo momento una única dosis de eCG (Sincropart® PMSG 6000 UI, CEVA Salud Animal SA; Barcelona, España) de la siguiente manera: 10 ovejas ++ y 10 ovejas R+ recibieron 480 UI de eCG (dosis estándar utilizada en IA en las ganaderías de esta raza; lotes “++480” y “R+480”, respectivamente), y 10 ovejas R+ recibieron 240 UI de eCG (lote “R+240”).

No se utilizaron machos para detección de celos con el fin de reproducir las condiciones de IA de las ganaderías, así como para evitar un posible adelanto de la descarga preovulatoria de LH y de la ovulación (Signoret y Cognié, 1975; Maxwell 1986; Romano et al., 2001).

### Toma de muestras sanguíneas

Se tomaron muestras de sangre de todas las ovejas mediante punción yugular utilizando tubos con heparina de litio. La toma de muestras se inició en el momento de la retirada de la esponja de FGA (0 h), a intervalos de 6 horas durante las 24 horas siguientes y cada 4 horas desde las 24 hasta las 72 horas (17 muestras por animal). Inmediatamente tras la obtención, las muestras fueron centrifugadas durante 25 minutos a 2100 x g para obtener el plasma que fue congelado a -20°C y almacenado hasta su posterior análisis de LH.

### Determinación de la tasa de ovulación

Con el objetivo de verificar la ocurrencia de la ovulación, ésta se determinó en todos los animales por endoscopia siete días después de la

retirada de la esponja, siguiendo la metodología descrita previamente (Lahoz et al., 2011).

### Análisis hormonales

Las muestras se analizaron mediante un kit ELISA comercial (LH-DETECT, ReproPharm, INRA Tours, Nouzilly, France), siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite de detección fue 0,3 ng/ml. Los coeficientes de variación intraanálisis e interanálisis fueron los siguientes: para un pool de 28,2 ng/ml, 7,4 y 10,9%; para un pool de 45,5 ng/ml, 6,7 y 10,4%, respectivamente. Las muestras con valores sospechosamente anómalos se volvieron a analizar.

### Análisis estadístico

Para la caracterización de la descarga preovulatoria de LH se consideraron las siguientes variables: Su concentración máxima (ng/ml), tiempo al pico preovulatorio de LH, comienzo, final y duración del pico preovulatorio de LH (en horas tras la retirada de la esponja) y área del pico preovulatorio de LH [(ng/ml)•h].

El tiempo al pico preovulatorio de LH se calculó como las horas transcurridas desde la retirada de la esponja hasta el momento de máxima concentración de LH. La hora de comienzo del pico preovulatorio de LH se determinó como la de la toma anterior al pico de LH con una concentración por debajo del límite de detección más cercana al pico preovulatorio. De igual modo, la hora del final del pico preovulatorio de LH se determinó como la de la toma posterior al pico de LH con una concentración por debajo del límite de detección más cercana al pico preovulatorio de LH. La duración del pico preovulatorio de LH se calculó como la diferencia entre ambas horas. El área bajo el pico de LH se calculó mediante la regla trapezoidal.

Dichas variables, junto con el peso y la condición corporal, se analizaron mediante ANOVA,

utilizando el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., 2011). El modelo incluyó el genotipo y la dosis de eCG jerarquizada al genotipo como efectos fijos. La normalidad de los residuos se comprobó con el test de Jarque-Bera (Procedimiento AUTOREG de SAS), aplicando la corrección para muestras finitas (Lawford, 2005). La falta de normalidad sólo se observó en la concentración máxima de LH. Mediante el procedimiento TRANSREG de SAS, se determinó que la transformación más conveniente para esta variable era la transformación logarítmica. La homogeneidad de las varianzas se comprobó mediante el test de Levene. La falta de homogeneidad se observó en las siguientes variables: horas al pico preovulatorio de LH, y comienzo y final del mismo. En dichas variables, la significación corregida por comparaciones múltiples de las diferencias entre las medias de mínimos cuadrados (LSMEANS) se determinó mediante el método MaxT con simulación y corrección de Satterthwaite para los grados de libertad (Westfall *et al.*, 2011a). Para el resto de variables, se aplicó el ajuste por etapas de Shaffer con simulación (Shaffer, 1986; Westfall, 1997), incluyendo restricciones lógicas. En ambos casos se utilizó el comando LSMESTIMATE (Westfall *et al.*, 2011b).

Las correlaciones se analizaron mediante el procedimiento CORR de SAS.

## Resultados

### Observación de las ovulaciones y valores anómalos de LH

Todas las ovejas ovularon, aunque en dos de ellas no se pudo determinar exactamente el número de cuerpos lúteos por la presencia de adherencias a nivel del ovario. Una oveja del lote ++0 fue eliminada del estudio ya que no presentó pico preovulatorio de LH, presentando una concentración máxima de 0,4 ng/ml

a las 6 horas de la retirada de la esponja. Dicha oveja presentó dos cuerpos lúteos de aspecto más reciente comparado con el resto de ovejas. Una oveja del lote ++480 fue eliminada por presentar un pico débil de LH anormalmente retrasado (concentración máxima a las 60 horas de 8,76 ng/ml). En el momento de la endoscopia presentó dos cuerpos lúteos. Mientras que en la mayoría de ovejas las concentraciones basales de LH estuvieron por debajo del límite de detección (datos no presentados), una oveja del lote R+240 presentó una LH basal extremadamente alta ( $5,9 \pm 0,6$  ng/ml; media  $\pm$  DS), y cinco cuerpos lúteos, por lo que también fue excluida del estudio (Figura 2). Todas las ovejas presentaron el pico preovulatorio de LH a partir de las 24 horas tras la retirada de la esponja.

### Efecto del alelo FecX<sup>R</sup>

No se observó ninguna diferencia significativa en ninguna de las variables estudiadas entre ovejas de los genotipos R+ y ++, independientemente de si fueron tratadas o no con eCG. Las concentraciones medias de LH no fueron significativamente diferentes entre los dos genotipos, y el pico preovulatorio de LH apareció en tiempos muy similares (Tabla 2, Figura 1).

### Efecto del tratamiento con eCG

El tratamiento con eCG adelantó significativamente el pico preovulatorio de LH, su comienzo y finalización, en ambos genotipos, mientras que no tuvo ningún efecto sobre el resto de variables. Cuando no se aplicó eCG, el pico preovulatorio de LH se produjo a las  $48,4 \pm 2,7$  h en las ovejas ++ y a las  $52,8 \pm 2,6$  h en las ovejas R+ (NS).

En las ovejas ++, el tiempo transcurrido desde la retirada de la esponja hasta el pico preovulatorio de LH fue 11,1 horas menor en las ovejas tratadas con eCG ( $P < 0,01$ ), comenzando y

Tabla 2. Características del pico preovulatorio de LH en ovejas portadoras heterocigotas del alelo *FecX<sup>R</sup>* y no portadoras, tratadas o no con dos dosis diferentes de eCG (240 y 480 UI). Medias de mínimos cuadrados (LSMEANS)  $\pm$  error estándar  
 Table 2. Characteristics of preovulatory LH surge in *FecX<sup>R</sup>* heterozygous carrier and non-carrier ewes, treated or not with two different doses of eCG (240 and 480 IU). Least squares means (LSMEANS)  $\pm$  standard error

Genotipo	++			R+			Significación (P <)	
	0	480	0	480	240	Genotipo	Dosis eCG*	
Numero de ovejas	9	9	10	10	9	-	-	
Tiempo al pico (h)	48,4 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	37,3 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	52,8 $\pm$ 2,6 <sup>ac</sup>	40,8 $\pm$ 2,2 <sup>d</sup>	40,9 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	NS	0,001	
Comienzo del pico (h)	43,6 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>	31,6 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	45,6 $\pm$ 2,7 <sup>c</sup>	34,0 $\pm$ 1,8 <sup>d</sup>	35,6 $\pm$ 1,4 <sup>d</sup>	NS	0,001	
Final del pico (h)	59,1 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	46,2 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	64,0 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	50,4 $\pm$ 2,4 <sup>b</sup>	51,1 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	NS	0,001	
Duración del pico (h)	15,6 $\pm$ 0,4	14,7 $\pm$ 0,9	18,4 $\pm$ 0,9	16,4 $\pm$ 1,3	15,6 $\pm$ 0,8	0,1	NS	
Conc. máxima (ng/ml)	51,0 $\pm$ 8,4	49,8 $\pm$ 5,9	40,3 $\pm$ 4,3	33,0 $\pm$ 4,5	45,5 $\pm$ 5,8	0,1	NS	
Área del pico (ng/ml)·h	271,0 $\pm$ 31,0	265,4 $\pm$ 31,0	228,4 $\pm$ 29,4	204,9 $\pm$ 29,4	271,9 $\pm$ 31,0	NS	NS	

Diferencias entre dosis de eCG sólo dentro de cada genotipo: Dentro de una misma fila, <sup>a,b</sup>P < 0,01; <sup>c,d</sup>P < 0,05. ++: Ovejas de genotipo salvaje.

R+: Ovejas heterocigotas para el alelo *FecX<sup>R</sup>*.

\* Dosis dentro de Genotipo. Sincropart® PMSG 6000 UI, CEVA Salud Animal SA (Barcelona, España).

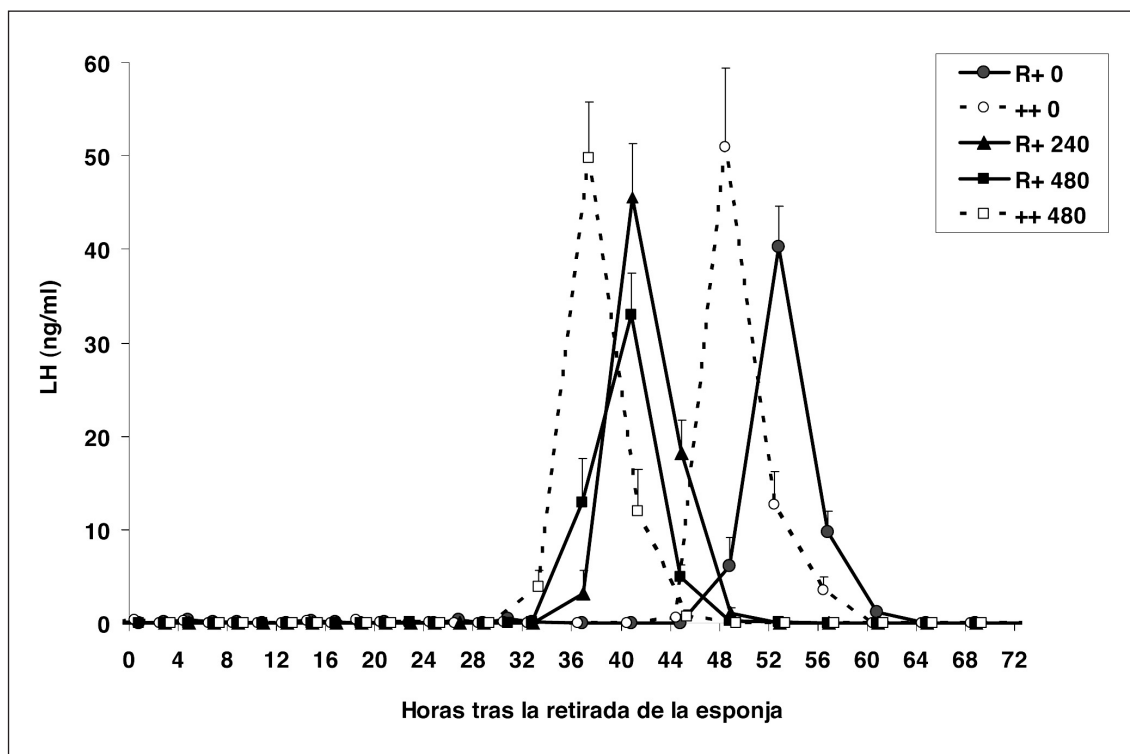


Figura 1. Pico preovulatorio de LH en ovejas portadoras heterocigotas del alelo  $FecX^R$  y no portadoras, tratadas o no con dos dosis diferentes de eCG (240 y 480 UI). Se han representado las medias de cada grupo.

++: Ovejas de genotipo salvaje.

R+: Ovejas heterocigotas para el alelo  $FecX^R$ .

Figure 1. Preovulatory LH surge in  $FecX^R$  heterozygous carrier and non-carrier ewes, treated or not with two different doses of eCG (240 and 480 IU). Means of each group are shown.

finalizando 12 y 12,9 horas antes, respectivamente (ambos  $P < 0,01$ ), sin afectar a la duración, concentración máxima o área del mismo.

En las ovejas R+, la eCG adelantó el pico preovulatorio de LH respecto a las ovejas R+ no tratadas, tanto cuando se trataron con 480 UI (-12 h,  $P < 0,05$ ), como con 240 UI (-11,9 h,  $P < 0,01$ ). Tanto en las ovejas R+480 como en las R+240, la descarga preovulatoria de LH comenzó antes (-11,6 h y -10 h; ambos  $P < 0,05$ ), y finalizó antes (-13,6 h y -12,9 h; ambos  $P < 0,01$ ). No se observó ninguna dife-

rencia significativa en ninguna de las variables estudiadas entre las ovejas R+ tratadas con 480 UI o con 240 UI de eCG.

Aunque la eCG adelantó la aparición del pico preovulatorio de LH en ambos genotipos, los picos de LH mostraron rangos diferentes, como puede verse en la figura 2. Cuando se aplicó la dosis estándar de 480 UI a las ovejas ++, se obtuvo una gran sincronización en el pico preovulatorio de LH, con un 90% de animales que lo presentaron entre las 36 y 40 horas tras la retirada. Cuando se aplicó la

eCG a las ovejas R+, se observó una mayor dispersión en la presentación de los picos preovulatorios de LH en comparación con las ovejas ++. No hubo diferencias entre aplicar 240 o 480 UI de eCG.

En todos los grupos se observó una correlación muy significativa entre la concentración máxima de LH y el área del pico preovulatorio de LH (+0,87;  $P < 0,001$ ). En las ovejas R+

sin tratamiento, se observó una correlación positiva entre el área del pico preovulatorio de LH y la tasa de ovulación posterior (+0,83;  $P < 0,01$ ), y una tendencia a la significación entre la concentración máxima de LH y la tasa de ovulación (+0,57;  $P < 0,1$ ); Figura 3. No se observó ninguna correlación significativa entre la tasa de ovulación y ambas variables en ovejas ++, o en ambos genotipos cuando fueron tratados con eCG.

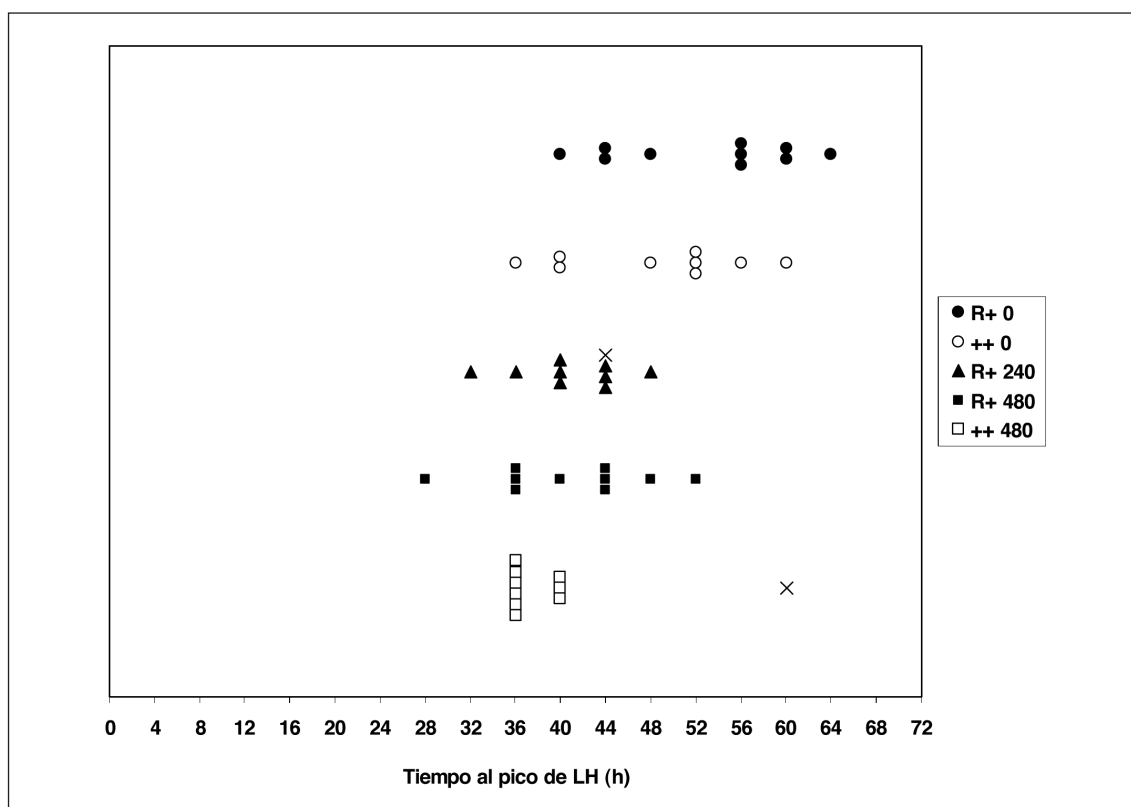


Figura 2. Sincronización de los picos preovulatorios de LH en cada uno de los lotes de ovejas portadoras heterocigotas del alelo  $FecX^R$  y no portadoras, tratadas o no con dos dosis diferentes de eCG (240 y 480 UI). Se han representado los valores individuales de cada animal (Dotplot).

El tiempo al pico de LH corresponde con las horas desde la retirada de las esponjas de 30 mg de FGA hasta el momento de máxima concentración de LH. Las ovejas excluidas del estudio por presentar valores anómalos se han representado con el símbolo "x".

Figure 2. Synchronization of preovulatory LH surges in experimental groups of  $FecX^R$  heterozygous carrier and non-carrier ewes, treated or not with two different doses of eCG (240 and 480 IU). Individual values for each ewe are shown (Dotplot).



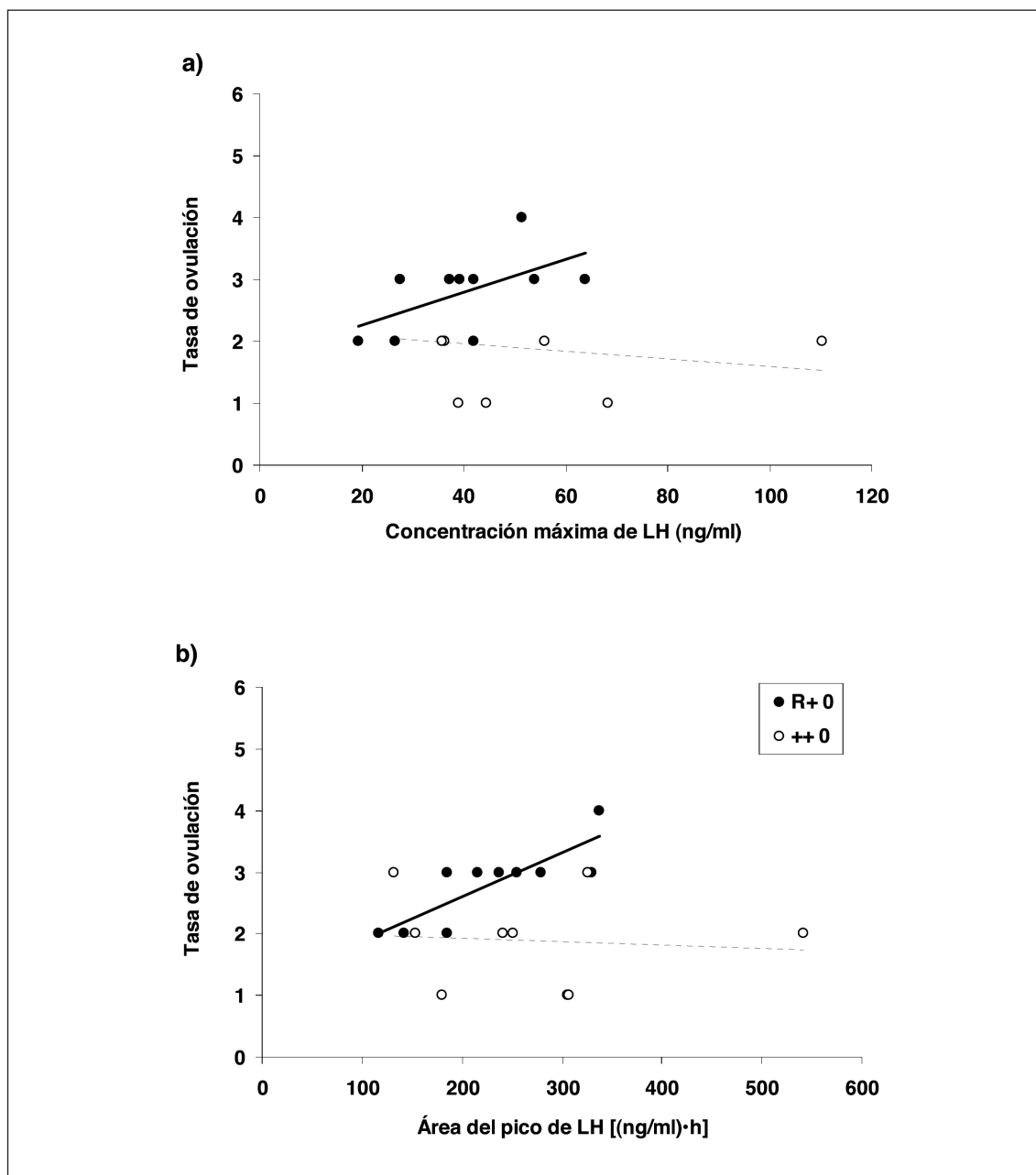


Figura 3. Correlación entre: a) la concentración máxima de LH y la tasa de ovulación; b) el área del pico preovulatorio de LH y la tasa de ovulación; en ovejas portadoras heterocigotas del alelo  $FecX^R$  (R+) y no portadoras (++) no tratadas hormonalmente.

Figure 3. Correlation between: a) the maximum concentration of LH and ovulation rate, b) the area of the preovulatory LH surge and ovulation rate, in  $FecX^R$  heterozygous carrier and non-carrier ewes, hormonally untreated.

## Discusión

Nuestros resultados muestran que la presencia del alelo *FecX<sup>R</sup>* no afecta al pico preovulatorio de LH en ovejas Rasa Aragonesa. Estos resultados concurren con los observados por otros autores que han estudiado mutaciones similares localizadas en genes pertenecientes a la familia del TGF- $\beta$ , como son *BMP15* y su receptor *BMPR-1B*. Así, Shackell et al. (1993) observaron que las ovejas de raza Inverdale heterocigotas portadoras de una mutación similar (*FecX<sup>I</sup>*) en el mismo gen (*BMP15*) no presentaban diferencias en relación a los niveles plasmáticos de P4, inhibina, o de gonadotropinas pituitarias en relación a ovejas no portadoras. De igual modo, Campbell et al. (2003) tampoco observaron diferencias endocrinas en ovejas Booroola homocigotas para esta mutación.

Por el contrario, en ovejas de raza Lacaune homocigotas para la mutación *FecL<sup>L</sup>*, se han encontrado importantes diferencias endocrinas entre ovejas silvestres (++) y portadoras (LL). En concreto, se ha observado que el pico preovulatorio de LH estaba adelantado en las ovejas portadoras de la mutación (Drouilhet et al., 2010). Hay que tener en cuenta que, aunque esta mutación también incrementa la tasa de ovulación, no se trata de una mutación en el gen *BMP15*, como es el caso del polimorfismo hiperprolífico *FecX<sup>L</sup>* también descrito en esta raza (Bodin et al., 2007), sino en otro gen recientemente identificado en el cromosoma 11. Además, estudios recientes parecen indicar que el incremento de la tasa de ovulación debido a *FecL<sup>L</sup>* se produciría siguiendo una ruta fisiológica diferente a la que siguen los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  (Mansanet et al., 2012), por lo que no puede compararse directamente.

El tratamiento con esponjas de FGA y eCG en ovejas se aplica en Aragón (España) desde hace años con fines genéticos o comerciales (Folch et al., 1979). Actualmente, es una prác-

tica muy habitual. Sirva a modo de ejemplo que durante el año 2012, dentro del programa de selección de la UPRA-Grupo Pastores constituido por 204.360 ovejas (a 30/12/2012), se realizaron 9.835 tratamientos con esponja + eCG para realizar IA (datos cedidos por la Asociación). Ese mismo año, de las más de 400.000 ovejas que forman parte de la Cooperativa Carnes Oviaragón S.C.L., 35.588 (alrededor del 10%) recibieron un tratamiento de esponja + eCG para realizar monta natural. A pesar de ello, hasta donde nosotros conocemos no existen datos publicados sobre el pico preovulatorio de LH en estas condiciones, lo cual es importante de cara a futuras decisiones, especialmente a la hora de planificar la IA. En los estudios previos realizados en ovejas de esta raza se determinó la concentración del pico de LH cuando fueron tratadas sólo con una esponja de FGA (42,5 ng/ml; Alabart et al., 1988). En estudios posteriores se observó que aplicando un tratamiento de superestimulación con FSH/LH, o FSH/LH más GH, el tiempo al pico así como la concentración máxima fueron 32,0 h y 34,3 ng/ml, y 34,6 h y 27,1 ng/ml, respectivamente, algo inferiores a los observados en el presente estudio (Folch et al., 2001). En estudios anteriores realizados en condiciones similares (esponjas intravaginales de FGA y 500 UI de eCG) pero en ovejas de raza Manchega, se observó que el pico de LH apareció de media a las 37,1 h y las ovulaciones ocurrieron a las 64,3 horas de media (entre las 61 y 66 horas tras la retirada de la esponja), con un intervalo constante del celo al primer incremento de la concentración de LH (3,4 horas; López-Sebastian, 1991). Cumming et al. (1973), también observaron que en ovejas sincronizadas con progestágenos el intervalo entre el pico preovulatorio de LH y la ovulación era constante (entre 21 y 26 horas). Por lo tanto, a partir de nuestros datos podríamos estimar que el momento de ovulación en las ovejas Rasa Aragonesa tratadas con eCG estaría en torno a las 61-66 horas. Teniendo en cuenta

que la IA a tiempo fijo en las ganaderías se realiza a las  $54 \pm 1$  h, y que el tiempo estimado de migración de los espermatozoides desde la vagina hasta el oviducto es de 8-10 horas (Hunter et al., 1980; Druart et al., 2009), nuestros resultados parecen indicar que el momento de IA que se viene utilizando en las ganaderías es adecuado.

La eCG adelantó la descarga preovulatoria de LH en todas las ovejas, tal y como ya describieron Cognié et al. (1970). Sin embargo, los patrones de agrupación de los picos preovulatorios de LH obtenidos en ambos genotipos fueron distintos. En las ovejas R+ tratadas con ambas dosis de eCG se obtuvo una menor sincronización que en las ovejas ++ tratadas. Las causas de dichas diferencias no pueden ser dilucidadas en el presente trabajo; tal vez pudieran estar relacionadas con diferencias en su foliculogénesis y tasa de ovulación.

En resumen, la respuesta de LH a la aplicación de eCG fue similar en ambos genotipos, ya que no se observó ninguna diferencia significativa en ninguna de las variables estudiadas relacionadas con la LH entre ovejas portadoras o no. Por lo tanto, en el caso de realizar IA a ovejas R+, se harían extensivas las recomendaciones sobre el momento de IA de las ovejas ++. Tampoco se encontraron diferencias en relación a la dosis de eCG aplicada cuando se compararon los resultados entre las ovejas R+ tratadas con 480 UI o con 240 UI de eCG. Estos resultados son importantes porque posibilitan la elección de la dosis de eCG a aplicar a las ovejas R+ en función de la capacidad de gestión de los partos múltiples del ganadero, sin afectar a la descarga preovulatoria de LH, y por tanto, a los resultados de la IA. Con una dosis reducida de eCG en las ovejas R+ (240 UI), se obtendrá una tasa de ovulación similar a la de ovejas ++ tratadas con una dosis estándar de 480 UI, sin que esto afecte a su pico preovulatorio de LH. Si se aplicase una dosis estándar de 480 UI de eCG a las R+, se lograría una mayor prolificidad

debido a un aumento del porcentaje de partos triples y de orden superior, pero sin que se viese afectado el pico preovulatorio de LH.

Estudios previos llevados a cabo en ganaderías de Oviaragón-Grupo Pastores sobre resultados de fertilidad de más de 16.000 ovejas inseminadas a tiempo fijo utilizando 480 UI de eCG mostraron que las hembras R+ tuvieron una fertilidad igual o superior a la de las ovejas no portadoras (Alabart et al., 2009). Resultados similares se obtuvieron en trabajos experimentales realizados con un número más reducido de animales en las instalaciones del CITA (Zaragoza, España). Se observó que la fertilidad del lote ++480 fue del 40%, mientras que la de los lotes R+480 y R+240 fue del 61% y 58%, respectivamente (Datos no publicados). Con los resultados del presente estudio, se demostraría que no se debieron a diferencias en la descarga preovulatoria de LH. Al tratarse de fertilidad al parto, podrían estar relacionados con la mayor tasa de ovulación de la ovejas R+, o bien a otros parámetros relacionados con la fertilidad que no han sido estudiados todavía en este genotipo.

En las ovejas portadoras del alelo *FecX<sup>R</sup>* se observó una correlación significativa entre el área total del pico de LH, su concentración máxima y la tasa de ovulación, como puede verse en la figura 3. Hasta donde nosotros conocemos, no existen trabajos similares al respecto. En trabajos previos llevados a cabo por nuestro equipo, se observó que las ovejas R+ tratadas con FSH presentaban un mayor número de folículos ováricos de un menor diámetro respecto a las ovejas ++ (Lahoz et al., 2013). Estos resultados apoyarían la hipótesis según la cual las ovejas *Fec* heterocigotas tendrían un mayor número de folículos de menor diámetro susceptibles de ovular (Fabre et al., 2006).

En conclusión, el tratamiento actualmente comercializado de esponjas vaginales de 30 mg de FGA y 480 UI de eCG induce una buena sin-

cronización del pico preovulatorio de LH en ovejas ++ Rasa Aragonesa adultas en otoño. La presencia del alelo *FecX<sup>R</sup>* no tuvo ningún efecto sobre el pico preovulatorio de LH, independientemente de la dosis de eCG utilizada. Estos datos refuerzan la recomendación de que la dosis de eCG aplicada a las ovejas R+ deberá adaptarse a las necesidades y posibilidades de la explotación, sin que afecte a los resultados de la IA. No es recomendable modificar el momento de realizar la IA cervical a tiempo fijo en ninguno de los dos genotipos.

### Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado con fondos del Proyecto TRACE PET-2008-0076. B. Lahoz disfruta de una beca predoctoral INIA. Los autores quieren agradecer a E. Echegoyen y a R. Mozo su colaboración en la toma de muestras, y a los compañeros de UPRA-Grupo Pastores la cesión de los datos sobre tratamientos hormonales.

### Bibliografía

- Alabart JL y Folch J, 1988. Immunization against androstenedione of Rasa Aragonesa ewes submitted to two moderate feeding levels in winter. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Dublin, Ireland, June 26-30, 1988, pp. 488.
- Alabart JL, Martínez-Royo A, Lahoz B, Calvo JH, Martí JJ, Jurado JJ, Vijil E, Fantova E, Folch J, 2009. Fertilidad y prolificidad de las ovejas portadoras o no portadoras del alelo *FecX<sup>R</sup>* inseminadas en las ganaderías de UPRA-Grupo Pastores. XXXIV Congreso nacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Barbastro (Huesca), España, 16-19 de septiembre de 2009, pp. 387-392.
- Alonso de Miguel M, 1979. La actividad sexual de la oveja Rasa Aragonesa durante el periodo denominado de anestro estacionario. Algunos factores que la modifican. Simposio sobre reproducción de ovinos y bovinos de carne. Ed. INIA. Monografía nº 42: 11-40.
- Bodin L, Di Pasquale E, Fabre S, Bontoux M, Monget P, Persani L, Mulsant P, 2007. A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. *Endocrinology* 148: 393-400.
- Campbell BK, Baird DT, Souza CJ, Webb R, 2003. The *FecB* (Booroola) gene acts at the ovary: in vivo evidence. *Reproduction* 126: 101-111.
- Cognié Y, Mariana JC, Thimonier J, 1970. Etude du moment d'ovulation chez la brebis normale ou traitée par un progestagène associé ou non a une injection de PMSG. *Annales De Biologie Animale Biochimie Biophysique* 10: 15-24.
- Cumming IA, Buckmaster JM, Blockey MAD, Goding JR, Winfield CG, Baxter RW, 1973. Constancy of interval between luteinizing-hormone release and ovulation in the ewe. *Biology of Reproduction* 9(1): 24-29.
- Drouilhet L, Taragnat C, Fontaine J, Duittoz A, Mulsant P, Bodin L, Fabre S, 2010. Endocrine characterization of the reproductive axis in highly prolific Lacaune sheep homozygous for the *FecL<sup>L</sup>* mutation. *Biology of Reproduction* 82(5): 815-824.
- Druart X, Cognié J, Baril G, Clement F, Dacheux JL, Gatti JL, 2009. In vivo imaging of in situ motility of fresh and liquid stored ram spermatozoa in the ewe genital tract. *Reproduction* 138(1): 45-53.
- Fabre S, Pierre A, Mulsant P, Bodin L, Di Pasquale E, Persani L, Monget P, Monniaux D, 2006. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4: 20.
- Fantova E, Pardos L, Bru Ch, Buñuel M, Cuartielles I, Larráz V, 2011. Influencia de la estacionalidad de la producción de corderos en explotaciones ovinas de carne en Aragón. XXXVI Congreso nacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. San Sebastian, España, 5-7 de octubre de 2011, pp. 265-268.

- Folch J, Alonso M, Cognié Y, Roca M, Ibañez I, Urbieta J, 1979. La inseminación artificial ovina en las ganaderías de carne del Valle del Ebro. ITEA-Información Técnica Económica Agraria 36: 9-14.
- Folch J y Alabart JL, 1999. Respuesta al efecto macho de ovejas Rasa Aragonesa según su estado cíclico tratadas o no con melatonina en primavera. VIII Jornadas sobre Producción Animal, Zaragoza (España), 11-13 May 1999. ITEA-Información Técnica Económica Agraria, Vol. Extra 20, 2: 651-653.
- Folch J, Ramon JP, Cocero MJ, Alabart JL, Beckers JF, 2001. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology* 55(9): 1777-1785.
- Forcada F, Abecia JA, Sierra I, 1992. Seasonal changes in oestrus activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different body condition levels. *Small Ruminant Research* 8(4): 313-325.
- Hunter RHF, Nichol R, Crabtree SM, 1980. Transport of spermatozoa in the ewe: timing of the establishment of a functional population in the oviduct. *Reproduction Nutrition Development* 20(6): 1869-1875.
- Jabbour HN y Evans G, 1991. Fertility of superovulated ewes following intrauterine or oviductal insemination with fresh or frozen-thawed semen. *Reproduction Fertility and Development* 3(1): 1-7.
- Lahoz B, Alabart JL, Jurado JJ, Calvo JH, Martínez-Royo A, Fantova E, Folch J, 2011. Effect of the *FecX<sup>R</sup>* polymorphism in the bone morphogenetic protein 15 gene on natural or equine chorionic gonadotropin-induced ovulation rate and litter size in Rasa Aragonesa ewes and implications for on-farm application. *Journal of Animal Science* 89: 3522-3530.
- Lahoz B, Alabart JL, Folch J, Sánchez P, Echegoyen E, Cocero MJ, 2013. Influence of the *FecX<sup>R</sup>* allele in heterozygous ewes on follicular population and outcomes of IVP and ET using LOPU-derived oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. Doi: 10.1111/rda.12150. In press.
- Lawford S, 2005. Finite-sample quantiles of the Jarque-Bera test. *Applied Economics Letters* 12: 351-354.
- López-Sebastian A, 1991. Descarga preovulatoria de LH y momento de la ovulación en ovejas con celo inducido mediante progestágeno y PMSG. *Investigación Agraria* 6: 123-131.
- Mansanet C, Drouilhet L, Bardou P, Sary J, Tabet K, Bodin L, Mulsant P, Fabre S, 2012. Identification of the *FecL* fecundity major gene controlling prolificacy in the Lacaune sheep breed. 17th International Congress on Animal Reproduction (ICAR). Vancouver, Canadá, July 29 - August 2, 2012. *Reproduction in Domestic Animals* 47(SI, Suppl. 4): 491-492.
- Martínez-Royo A, Jurado JJ, Smulders JP, Martí JJ, Alabart JL, Roche A, Fantova E, Bodin L, Mulsant P, Serrano M, Folch J, Calvo JH, 2008. A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. *Animal Genetics* 39: 294-297.
- Maxwell WMC, 1986. Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronized estrus. 1. Effect of time of onset of estrus, ovulation and insemination on fertility. *Animal Reproduction Science* 10: 301-308.
- Pardos L, Maza MT, Fantova E, Sepúlveda W, 2008. The diversity of sheep production systems in Aragon (Spain): characterisation and typification of meat sheep farms. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6(4): 497-507.
- Pardos L, Fantova E, Bru Ch, Buñuel M, Cuartielles I, Larraz V, 2010. Influencia de la presencia del alelo ROA y de la selección por prolificidad poligénica en los resultados económicos de explotaciones ovinas de carne en Aragón. XXXV Congreso nacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Valladolid, España, 16-19 de septiembre de 2010, pp. 461-465.
- Romano JE, Abella DF, Villegas N, 2001. A note on the effect of continuous ram presence on estrus onset, estrus duration and ovulation time in estrus synchronized ewes. *Applied Animal Behaviour Science* 73(3): 193-198.
- Russel AJF, Doney JM, Gunn RG, 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 72: 451-454.
- SAS Institute Inc. 2011. SAS OnlineDoc® 9.3. Cary, NC: SAS Institute Inc.

- Shackell GH, Hudson NL, Heath DA, Lun S, Shaw L, Condell L, Blay LR, McNatty KP, 1993. Plasma gonadotropin concentrations and ovarian characteristics in Inverdale ewes that are heterozygous for a major gene (*FecX<sup>l</sup>*) on the X Chromosome that influence ovulation rate. *Biology of Reproduction* 48(5): 1150-1156.
- Shaffer JP, 1986. Modified Sequentially Rejective Multiple Test Procedures. *Journal of the American Statistical Association* 81: 329-335.
- Sierra I, 1969. Posibilidades de industrialización de las empresas de Ganado Ovino de aptitud cárnica en el valle del Ebro. *Archivos de Zootecnia* 18: 70-113.
- Signoret JP y Cognié Y, 1975. Determination of the moment of ovulation in ewe and sow. Influence of environment and hormonal treatment. *Annales De Biologie Animale Biochimie Biophysique* 15: 205-214.
- Westfall PH, 1997. Multiple Testing of General Contrasts Using Logical Constraints and Correlations. *Journal of the American Statistical Association* 92: 299-306.
- Westfall PH, Tobias RD, Wolfinger RD, 2011a. Approximate Multiple Comparisons under Heteroscedasticity: The MaxT Method for Multiple Comparisons under Heteroscedasticity. In: Westfall PH, Tobias RD, Wolfinger RD, 2011. *Multiple Comparisons and Multiple Tests Using SAS®, Second Edition*. Cary, NC: SAS Institute Inc., pp. 282-284.
- Westfall PH, Tobias RD, Wolfinger RD, 2011b. *Multiple Comparisons and Multiple Tests Using SAS®, Second Edition*. Cary, NC: SAS Institute Inc., pp. 282-284.

(Aceptado para publicación el 25 de abril de 2013)