

## LAPAROSCOPIC OVUM PICK-UP (LOPU) EN OVEJAS RASA ARAGONESA PORTADORAS O NO DEL ALELO *FecX<sup>R</sup>* DEL GEN *BMP15*: RENDIMIENTO, DIÁMETRO FOLICULAR Y EFECTO DEL TRATAMIENTO ESTIMULATORIO CON FSH

Lahoz, B.<sup>1</sup>, Folch, J.<sup>1</sup>, Cocero, M.J.<sup>2</sup>, Echegoyen, E.<sup>1</sup>, Sánchez, P.<sup>1</sup> y Alabart, J.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) de Aragón. Av. de Montañana 930. 50059 Zaragoza. España. E-mail: [blahozc@aragon.es](mailto:blahozc@aragon.es).

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Ctra. La Coruña km 7,500. 28040 Madrid. España.

### INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha descubierto una variante génica natural (alelo *FecX<sup>R</sup>*, alelo ROA, "Rasa Oviaragón") en el gen *BMP15* (bone morphogenetic protein-15) que produce un incremento de la prolificidad en heterocigosis y esterilidad en homocigosis (Martínez-Royo et al., 2008). Las hembras heterocigotas para *FecX<sup>R</sup>* presentan un incremento de la tasa de ovulación de 0,63 (Lahoz et al., 2009), que se traduce en 0,32 corderos adicionales por parto (Jurado et al., 2008). El mecanismo exacto por el que se produce este incremento de la tasa de ovulación todavía no es bien conocido, aunque mutaciones similares en el gen *BMP15* en otras razas ocasionan una interrupción de la síntesis de proteína BMP15, esencial para el desarrollo folicular. Como consecuencia, las hembras heterocigotas presentan folículos antrales más pequeños, con menos células de la granulosa, una alteración en la sensibilidad a las gonadotropinas y con aparición precoz de los receptores de LH, lo que conduce a una mayor tasa de ovulación (Fabre et al., 2006).

La obtención de oocitos del animal vivo mediante la técnica de OPU es utilizada en diversas especies, principalmente en vacuno, con numerosas aplicaciones prácticas, como la producción *in vitro* de embriones, estudios de biología molecular, o la crioconservación de oocitos.

Los objetivos del presente estudio fueron en primer lugar, determinar si las ovejas heterocigotas para *FecX<sup>R</sup>* presentan un mayor número de folículos ováricos. En segundo lugar, determinar si existen diferencias en el diámetro folicular entre ovejas heterocigotas y no portadoras de la mutación. En tercer lugar valorar si existe una mayor respuesta de las ovejas heterocigotas a la estimulación con hormona foliculo estimulante (FSH).

### MATERIAL Y MÉTODOS

Las sesiones de LOPU se llevaron a cabo entre Noviembre de 2009 y Febrero de 2011 en las instalaciones del CITA. Se utilizaron un total de 16 ovejas heterocigotas del alelo *FecX<sup>R</sup>* (R+) y 16 ovejas no portadoras (++), adultas y con similar peso ( $54,1 \pm 10,1$  y  $55,5 \pm 7,3$ , Media $\pm$ SD, respectivamente) y condición corporal ( $3,6 \pm 0,3$  y  $3,7 \pm 0,3$ , respectivamente). En cada sesión se utilizaron entre 7 y 8 ovejas de cada genotipo, realizándose un total de 11 sesiones (172 punciones). Previamente, todos los animales recibieron dos dosis de 125  $\mu$ g de cloprostenol (Estrumate, Schering-Plough Animal Health, Madrid, España) separadas 8 días, y 5 días después de la segunda inyección recibieron una esponja de 30 mg acetato de fluorogestona (FGA; Sincropart 30 mg, CEVA Salud Animal S.A., Barcelona, España), que se sustituyó por una nueva al final de cada sesión. En las LOPUs realizadas sin estimulación hormonal (n=6) se realizó la punción folicular a los 12 días de la introducción de la esponja, y se repitió una segunda sesión 7 días después. En las sesiones con superestimulación (n=5), las ovejas recibieron un total de 32 mg de FSH (ULG, Lieja, Bélgica) administrados en dosis decrecientes: 8 mg (60 h), 8 mg (48 h), 6 mg (36 h), 6 mg (24 h) y 4 mg (12 h) previas a la LOPU. Junto con la primera inyección de FSH se aplicó 125  $\mu$ g de cloprostenol. La realización de la LOPU se basó en la técnica descrita por Alberio et al. (2002). Las hembras se pusieron en ayuno 24 horas antes de la LOPU. Fueron anestesiadas con 3 mg/kg peso vivo de propofol (Propofol Lipuro 1%, Braun, España) y conectadas a la anestesia inhalatoria con isoflurano (IsoFlo, Veterinaria Esteve, España). Se realizaron dos orificios de 1 cm cada uno a nivel abdomino-inguinal a través de los que se introdujo un endoscopio para visualizar el ovario y una pinza atraumática para su sujeción. Por una tercera vía se introdujo una aguja de 23G conectada a una bomba de vacío (-25 mm Hg; V-MAR 5100; Cook Ltd, Australia) para la punción y aspiración de los folículos, que fueron recogidos en un

tubo Falcon de 15 ml con medio de aspiración (Cocero et al., 2011). En el momento de la punción se anotó el número y diámetro de todos los folículos puncionados, utilizando para la medición una escala de 2 mm situada sobre la aguja. Las diferencias entre tratamientos o genotipos se analizaron mediante modelos lineales generalizados para variables categóricas, utilizando el PROC CATMOD de SAS (2004).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando no se aplicó tratamiento previo con FSH el número medio de folículos por oveja en el momento de la punción fue muy similar entre las ovejas R+ y ++ (9,7 y 9,2, respectivamente;  $P>0,05$ ) (Tabla 1). Estos resultados indicarían que no existe un efecto del genotipo *FecX<sup>R</sup>* sobre el número de folículos presentes en el ovario, en la misma línea que resultados previos de Haycock et al. (2006). En cuanto a la distribución de los tamaños foliculares, las ovejas R+ tuvieron un 7,5% más de folículos de 3 mm y un 6,9% menos de folículos  $>6$  mm que las ovejas ++ ( $P<0,05$  y  $P<0,01$ , respectivamente), con un diámetro folicular medio 0,5 mm inferior que las ovejas ++ ( $P<0,01$ ).

Cuando se sometieron a estimulación con FSH, las ovejas R+ presentaron una media de 17,8 folículos por oveja y las ovejas ++ 15,3 ( $P<0,06$ ). En estas condiciones de estimulación se acentuaron las diferencias en diámetros foliculares, presentando las ovejas ++ un 19,8% más de folículos mayores o iguales a 6 mm que las ovejas R+ (6 mm: 15,0% vs. 8,9%,  $P<0,01$ ;  $>6$ mm: 19,3% vs. 5,6%,  $P<0,0001$ ). Consecuentemente, el porcentaje de folículos de 3 y 4 mm fue significativamente mayor en las ovejas R+ que en las ++ (33,2% vs. 25,6%,  $P<0,01$ ; 30,4% vs. 17,7%,  $P<0,0001$ , respectivamente). El diámetro folicular medio de las ovejas R+ fue 1,0 mm menor que el de las ovejas ++ ( $P<0,0001$ ).

Teniendo en cuenta el tratamiento dentro de cada genotipo, en las ovejas ++ la FSH produjo un incremento significativo de los folículos de 5, 6 y mayores de 6 mm ( $P<0,0001$ ; 0,01 y 0,05; respectivamente), mientras que en las ovejas R+ la FSH incrementó significativamente tan solo los folículos de 4 y 5 mm ( $P<0,0001$  para ambos), pero no los de 6 o más de 6 mm. En estas condiciones el diámetro folicular medio se vio incrementado por efecto de la FSH en 0,8 mm en las ovejas ++ ( $P<0,0001$ ) mientras que en las R+ tan solo incrementó 0,3 mm ( $P<0,05$ ), siendo ambos incrementos significativamente diferentes entre sí ( $P<0,01$ ). En cuanto al número medio de folículos por oveja, la FSH produjo un incremento de 6,1 folículos en las ovejas ++ y 8,1 en las R+ ( $P<0,0001$  para ambos). Estos incrementos no fueron significativamente diferentes entre sí, por lo que a pesar de verse una tendencia hacia una mayor respuesta a la FSH en las hembras R+, con los resultados del presente estudio no es posible confirmarlo. En el presente trabajo, la FSH utilizada fue altamente purificada, con lo que se elimina un posible efecto de contaminación por LH. Por lo tanto, no es posible concluir que las ovejas R+ tengan una mayor sensibilidad a la FSH a nivel sistémico, ni una mayor población de folículos dependientes de gonadotropinas. Diversos autores han descrito en ovejas con mutaciones similares en los genes *Fec* un incremento en la sensibilidad a la FSH además de una expresión precoz de los receptores de la LH en los folículos antrales (Fabre et al., 2006), mientras que otros han demostrado tan solo una adquisición más temprana de la respuesta a la LH por parte de las células de la granulosa (McNatty et al., 2009).

En conclusión, las ovejas portadoras del alelo *FecX<sup>R</sup>* no presentaron un mayor número de folículos ováricos, pero su población folicular fue de menor diámetro y alcanzaron el estado preovulatorio a un diámetro menor. Las diferencias entre genotipos fueron más acusadas cuando se aplicó FSH. Por tanto, este polimorfismo no parece tener un efecto a nivel del número de folículos ováricos, aunque son necesarios futuros estudios para determinar si es responsable de una mayor sensibilidad a la FSH a nivel sistémico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberio, R., Olivera, J., Roche, A., Alabart, J.L., Folch, J. 2002. *Small Ruminant Res.* 46: 81-87.
- Cocero, M.J., Alabart, J.L., Hammami, S., Martí, J.I., Lahoz, B., Sánchez, P., Echegoyen, E., Beckers, J.F., Folch, J. 2011. *Reprod. Domest. Anim.* doi: 10.1111/j.1439-

0531.2010.01690.x. • Fabre, S., Pierre, A., Mulsant, P., Bodin, L., Di Pasquale, E., Persani, L., Monget, P., Monniaux, D. 2006. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4: 20. • Haycock, H.L., Hanrahan, J.P., Roche, J.F., Crowe, M.A. 2006. *Reprod. Domest. Anim.* 41(4): 371. • Jurado, J.J., Martínez-Royo, A., Calvo, J.H. 2008. *ITEA-Información Técnica Económica Agraria* 104: 149-154. • Lahoz, B., Alabart, J.L., Echegoyen, E., Sánchez, P., Calvo, J.H., Martínez-Royo, A., Jurado, J.J., Fantova, E., Folch, J. 2009. *XIII Jornadas sobre Producción Animal AIDA Zaragoza*. M. Joy et al. (Eds.). pp. 678-680. • Martínez-Royo, A., Jurado, J.J., Smulders, J.P., Martí, J.I., Alabart, J.L., Roche, A., Fantova, E., Bodin, L., Mulsant, P., Serrano, M., Folch, J., Calvo, J.H. 2008. *Anim. Genet.* 39(3): 294-297. • McNatty, K. P., Heath, D. A., Hudson, N. L., Lun, S., Juengel, J. L., Moore, L. G. 2009. *Reproduction* 138: 545-551.

**Agradecimientos:** Financiado por el proyecto TRACE PET-2008-0076 (MICINN). B. Lahoz recibe una beca de Formación de investigadores de tipo Predoctoral de INIA. Los autores quieren agradecer a J.F. Beckers (Laboratoire d'endocrinologie et de reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire, ULG, Liège, Belgique) el suministro de la FSH.

**Tabla 1.** Número medio de folículos por oveja y sesión, diámetro folicular medio (Medias  $\pm$  error estándar), y distribución de los diámetros foliculares (%) en función del genotipo (ovejas no portadoras y heterocigotas del alelo *FecX<sup>R</sup>*) y del tratamiento hormonal previo (con y sin FSH) en ovejas Rasa Aragonesa

Gen / Tto	N	n	MFO	3 mm	4 mm	5 mm	6 mm	>6 mm	DFM
++ -	46	422	9,2 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	46,4 <sup>ae</sup>	21,1	10,7 <sup>a</sup>	8,1 <sup>d</sup>	13,7 <sup>ce</sup>	4,6 $\pm$ 0,1 <sup>ac</sup>
++ FSH	38	581	15,3 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	25,6 <sup>bc</sup>	17,7 <sup>a</sup>	22,4 <sup>b</sup>	15,0 <sup>c</sup>	19,3 <sup>af</sup>	5,4 $\pm$ 0,1 <sup>bA</sup>
R+ -	47	458	9,7 $\pm$ 0,6 <sup>A</sup>	53,9 <sup>Af</sup>	19,2 <sup>A</sup>	12,2 <sup>A</sup>	7,9	6,8 <sup>d</sup>	4,1 $\pm$ 0,1 <sup>de</sup>
R+ FSH	40	711	17,8 $\pm$ 1,0 <sup>B</sup>	33,2 <sup>Bd</sup>	30,4 <sup>bB</sup>	21,9 <sup>B</sup>	8,9 <sup>d</sup>	5,6 <sup>b</sup>	4,4 $\pm$ 0,1 <sup>Bf</sup>

Dentro de cada columna, las siguientes combinaciones de letras indican diferencias significativas a los siguientes niveles: a,b ó A,B:  $p < 0,0001$ ; c,d:  $p < 0,01$ ; e,f:  $p < 0,05$ .

++: Ovejas no portadoras del alelo *FecX<sup>R</sup>*; R+: Ovejas heterocigotas del alelo *FecX<sup>R</sup>*

Gen: Genotipo; Tto: Tratamiento; N: número de ovejas; n: número de folículos aspirados totales; MFO: Número medio de folículos por oveja; DFM: Diámetro folicular medio.

#### LAPAROSCOPIC OVUM PICK-UP (LOPU) IN RASA ARAGONESA EWES CARRYING OR NOT THE *FecX<sup>R</sup>* ALLELE IN THE *BMP15* GENE: PERFORMANCE, FOLLICULAR DIAMETER AND EFFECT OF THE STIMULATION WITH FSH

**ABSTRACT:** A new polymorphism in the Bone Morphogenetic Protein 15 gene (*FecX<sup>R</sup>* allele) causing increased prolificacy in heterozygous ewes (R+) by an increase in ovulation rate has been recently described in Rasa Aragonesa ewes. Data from 2,172 follicles aspirated by the LOPU technique, with and without FSH treatment, in 16 R+ and 16 non carrier (++) ewes during 11 sessions were analyzed. Without FSH, the number of follicles present in the ovary was not significantly different between R+ and ++ ewes (9.7 and 9.2, respectively). FSH treatment led to 17.8 follicles in R+ ewes, mainly increasing 4 and 5 mm follicles (+11.2% and 9.7%,  $P < 0.0001$  for both) while in ++ ewes it produced 15.3 follicles, by increasing the percentage of 5, 6 and >6 mm follicles (+11.7%  $P < 0.0001$ , +6.9%  $P < 0.01$  and +5.6%  $P < 0.05$ , respectively). In conclusion, R+ ewes did not present a higher number of ovarian follicles, but their follicular population presented a significantly lower diameter. Further studies are necessary to determine if FSH sensitivity is increased in ewes carrying this polymorphism.

**Keywords:** Bone Morphogenetic Protein 15, gonadotropins, OPU, sheep.