ELECCIÓN DE LAS MEJORES OVEJAS DONANTES DE EMBRIONES MEDIANTE LA DETERMINACIÓN PLASMÁTICA DE SU AMH (HORMONA ANTI-MÜLLERIANA)

Lahoz B., Alabart J.L., Sánchez P., Echegoyen E., Folch J.
CITA de Aragón. Av. de Montañana 930. 50059 Zaragoza. blahozc@aragon.es

INTRODUCCIÓN

Desde 1998 en el CITA se utiliza la tecnología MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer) para la producción de moruecos a testar dentro del Programa de selección por prolificidad de UPRA-Grupo Pastores. Uno de los principales factores que limita el rendimiento de la técnica es la gran variabilidad individual en la respuesta de las donantes de embriones a los tratamientos de superovulación, de manera que más de un 20% presenta falta de respuesta al tratamiento superovulatorio, cuerpos lúteos regresados o algún otro tipo de problema reproductivo en el momento de la recuperación (Folch et al., 2009 y 2015). Poder seleccionar las mejores donantes antes de iniciar el tratamiento supondría una mejora del rendimiento de la técnica, así como un considerable ahorro económico, de mano de obra y una reducción del número de animales utilizados en el procedimiento. Para ello en el presente trabajo nuestro objetivo fue tratar de identificar las mejores donantes utilizando como predictor de la respuesta ovárica la hormona anti-Mülleriana (AMH). Esta hormona es producida en la hembra exclusivamente a nivel del ovario y ha demostrado ser un buen predictor de la población folicular ovárica capaz de responder a las gonadotropinas en varias especies (revisado por Monniaux et al., 2013). En estudios previos llevados a cabo en el CITA observamos que también en ovino, puede ser un buen predictor del número de folículos sensibles a gonadotropinas. En dicho estudio observamos que por cada 100 pg/ml que aumentaba su concentración plasmática se obtenían 5,1 folículos adicionales puncionables en cada sesión de LOPU (Laparoscopic ovum pick up), por lo que era posible identificar las ovejas que mejor responden en términos de folículos puncionables (Lahoz et al., 2014). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad de la AMH como predictor de las mejores ovejas donantes de embriones dentro de un programa MOET.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las donantes de embriones fueron ovejas adultas de raza Rasa Aragonesa seleccionadas en las ganaderías como madres de los futuros sementales a testar del esquema. Se realizaron dos sesiones MOET con un total de 18 ovejas, que fueron sometidas a una (n=12) o dos (n=6) sesiones, de manera que se dispone de un total de 24 recuperaciones. Cada donante recibió una esponja de FGA (acetato de fluorogestona; Sincropart 30 mg, CEVA Animal Health SA, Barcelona, España), que fue reemplazada por una nueva 6 días después (T-4). Cuatro días más tarde (T0), se aplicó la primera inyección de FSH porcina (Folltropin-V, Minitub Ibérica SL, Tarragona, España) de un tratamiento de superovulación consistente en 350 UI de FSH administradas en 8 dosis decrecientes. Se tomaron muestras de sangre para la determinación de AMH a T-4 y T0, utilizando tubos de heparina de litio. Las donantes se inseminaron 51 horas después de la retirada de la esponja. Ocho días tras la retirada de la esponja se determinó la tasa de ovulación mediante endoscopia y bajo anestesia general y se recuperaron los embriones mediante una sonda Foley (Foleycath, WRP, Sepang, Malaysia). Después de la evaluación morfológica de los embriones (IETS Manual, 4th edition), se transfirieron dos embriones (mórulas o blastocistos) de grado 1 y/o 2 a cada receptora previamente sincronizada. Por último se controlaron los partos y se confirmó la filiación mediante análisis genético.

Las concentraciones plasmáticas de AMH se determinaron utilizando un kit comercial ELISA de AMH para la especie equina (AnshLab, Webster, TX, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de 27,8 pg/ml, y el coeficiente de variación intra-ensayo fue del 4,8%.

Las correlaciones entre la concentración de AMH de cada animal y el número de cuerpos lúteos (CL), embriones recuperados (ER), embriones viables (EV) y corderos nacidos (CN) por oveja donante se calcularon mediante el coeficiente de correlación de Pearson. La normalidad de las variables se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre medias se calcularon mediante ANOVA de una vía. Se utilizó el software SPSS Statistics v.17.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de donantes con fallos ovulatorios o de fertilización fue del 16,7% (4/24). Estos fallos incluyen fallos de respuesta superovulatoria (≤2 CLs; n=3) y fallos totales de fertilización (n=1). El porcentaje de embriones recuperados fue del 57,5% (168/292), observándose un 8,3% de fallos totales de recuperación en ovejas que habían superovulado (n=2). Esas dos ovejas no se tuvieron en cuenta en el análisis.

Las concentraciones plasmáticas de AMH a T-4 y al inicio del tratamiento (T0) estuvieron altamente correlacionadas entre sí (r=0,95; p<0,001; Figura 1a). Esto parece indicar que se podría utilizar indistintamente una u otra como predictores de respuesta ovárica, en función de las posibilidades de muestreo. La concentración de AMH a T0 estuvo altamente correlacionada con la tasa de ovulación (r=0,70; p<0,001; Figura 1b), observándose una alta variabilidad individual en todas la variables estudiadas (Tabla 1). Las correlaciones entre la AMH y el resto de variables no alcanzaron la significación estadística (ER: r=0,33; EV: r=0,23; CN: r=0,15). Cuando únicamente se tuvieron en cuenta las donantes que no habían sido previamente sometidas a ninguna sesión de MOET, la correlación con la tasa de ovulación fue todavía mayor (r=0,82; p<0,001), aunque tampoco se alcanzó la significación estadística con el resto de variables (ER: r=0,29; EV: r=0,31; CN: r=0,30). Además de con la AMH, la tasa de ovulación también se correlacionó con el número de embriones recuperados (r=0,69; p<0,001), embriones viables y corderos nacidos (ambos r=0,57; p<0,01). Estos resultados parecen evidenciar que mejorar la tasa de ovulación de las donantes mediante la selección por AMH podría tener una repercusión positiva sobre el resto de variables de MOET. Además, sería necesario revisar el sistema de lavado utilizado, ya que los porcentajes de recuperación de embriones de este trabajo son sensiblemente inferiores a los descritos en trabajos anteriores (1998-2001: 72,2%; 2002-2007: 82,8%; Folch et al., 2009). En el presente trabajo esto podría estar afectando negativamente a las correlaciones entre la AMH y el resto de variables de MOET, más allá de la tasa de ovulación.

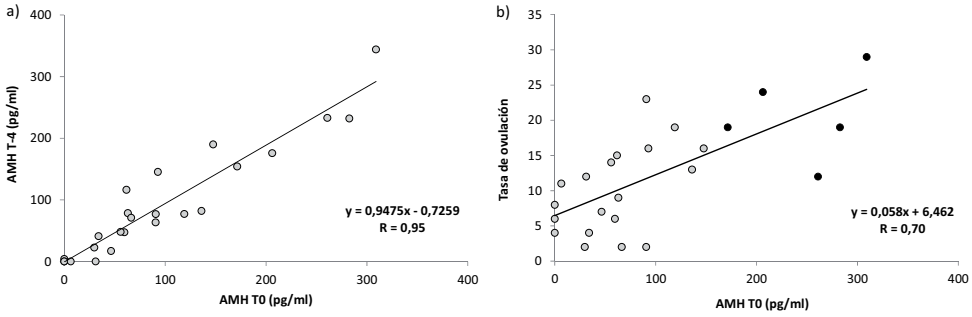


Figura 1. *Correlación entre la concentración plasmática de AMH a T-4 y a T0 (a) y entre la AMH a T0 y la tasa de ovulación (b). Los círculos negros representan las donantes con concentraciones de AMH por encima de 169 pg/ml (cut-off).*

En un trabajo previo (Lahoz et al., 2014) calculamos un punto de corte (cut-off) a partir del cual poder seleccionar las ovejas que mejor respondían a un tratamiento de estimulación con FSH, en ese caso dentro de un programa de LOPU. Cuando se aplicó dicho cut-off a las donantes del presente trabajo, el grupo de AMH ALTA (≥169 pg/ml) presentó 10,8 ovulaciones adicionales, 3,5 embriones recuperados, 3,3 embriones viables y 2 corderos extra respecto al grupo de AMH BAJA (Tabla 1). No obstante, en estas condiciones la aplicación del cut-off solo permitió seleccionar 5 donantes, y no se alcanzó la significación estadística en todas las variables. Si bien el trabajo anterior se realizó con otro kit comercial, y los protocolos de estimulación con FSH son diferentes de los de superovulación utilizados en este trabajo, los resultados ponen de manifiesto la utilidad de la AMH como predictor de la respuesta ovárica en diversas condiciones. No obstante sería necesario disponer de más datos para poder recalcular un cut-off óptimo para las condiciones de los programas MOET.

***Tabla 1**. Concentraciones plasmáticas de AMH (pg/ml) a T-4 y a T0 y variables relacionadas con MOET por oveja y por sesión.*

	AMH T-4	AMH T0	TO	ER	EV	CN
Total						
Media±EE	93±18	98±18	12,1±1,5	7,6±1,2	6,0±1,1	4,5±0,9
Rango	(0-344)	(0-309)	(2-29)	(0-17)	(0-15)	(0-13)
ALTA						
Media±EE	228±33[a]	246±25[a]	20,6±2,8[c]	10,5±2,6	8,7±3,1	6,0±2,5
Rango	(154-344)	(171-309)	(12-29)	(4-16)	(3-15)	(0-11)
BAJA						
Media±EE	57±12[b]	60±10[b]	9,8±1,4[d]	7,0±1,3	5,4±1,1	4,0±0,9
Rango	(0-190)	(0-148)	(2-23)	(0-17)	(0-14)	(0-13)

Total: todas las ovejas (n=24); ALTA: ovejas con AMH T0≥169 pg/ml (n=5); BAJA: ovejas con AMH T0<169 pg/ml (n=19).
Comparación ALTA-BAJA: dentro de una misma columna, a,b: p<0,001; c,d: p<0,01.

En conclusión, las concentraciones de AMH medidas en el plasma sanguíneo antes del tratamiento con FSH podrían utilizarse para predecir el número de ovulaciones por oveja donante, y así poder mejorar la eficiencia de los programas MOET. Poder instaurar un protocolo de determinación de la concentración de AMH en las ganaderías antes de seleccionar y trasladar las ovejas donantes permitiría una considerable mejora de la eficiencia y un importante ahorro económico. No obstante, son necesarios más datos para poder calcular la repetibilidad individual entre sesiones y tratar de ver si existe una correlación adicional con el resto de variables del programa MOET y con la calidad de los embriones que pudiera derivar de una mayor calidad de los oocitos de origen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Folch et al., 2009. 60th Annual Meeting EAAP, p. 275. • Folch et al., 2015. XVI Jornadas Prod. Anim. AIDA. • IETS Manual, 4th edition. • Lahoz et al., 2014. Theriogenology 81: 347-357. • Monniaux et al., 2013. Reprod Fertil Dev 25: 1-16.

Agradecimientos: Financiado por INIA (RTA2011-00128) y CDTI (IDI-20120768).

ELECTION OF THE BEST EMBRYO DONOR EWES BY DETERMINING THEIR PLASMA AMH (ANTI-MÜLLERIAN HORMONE)

ABSTRACT: Anti-Müllerian hormone (AMH) has been demonstrated to be a good predictor of the ovarian response to gonadotropins in several mammalian species. We aimed to test its usefulness in a MOET program in sheep, where the performance is widely known to be low mainly due to variable ovarian responses to FSH treatments. Two plasma AMH samples were obtained from each ewe and session at the time of the first FSH injection (T0) and 4 days before (T-4), and were analyzed using the AMH equine ELISA kit (AnshLab, Webster, TX, USA). The AMH concentrations as well as the other MOET-related variables were highly variable between individuals. The AMH at T0 was highly correlated with the total number of CL (r=0.70; p<0.01), although significance was not attained with the other MOET-related variables. The use of a previous determined cutoff (169 pg/ml) to detect high-responding ewes gave rise to an increase in ovulation rate of +10.8 (p<0.01), and to 3.5 additional recovered embryos and +2 extra lambs born per donor ewe and session (both p>0.05) when compared with low-responding ewes. In conclusion, plasma AMH concentrations measured before the FSH treatment could be used to predict the ovulatory response of donor ewes, and so to improve the efficiency of MOET programs. More data are necessary to assess the individual repeatability as well as the relationship of AMH with other MOET-related variables, in order to establish a reliable protocol to be implemented in farms before selecting and moving the donor ewes.

Keywords: anti-Müllerian hormone, embryo transfer, sheep, superovulation