

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
DEL MEDIO NATURAL



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Relación entre los niveles de AMH y, la respuesta superovulatoria y la viabilidad de los embriones en conejas tratadas con Corifolitropina alfa

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: *Paula Gómez Martínez*

TUTOR: *José Salvador Vicente Antón*

CURSO ACADÉMICO: 2018/2019

Valencia, Julio 2019



Título del TFG: Relación entre los niveles de AMH y, la respuesta superovulatoria y la viabilidad de los embriones en conejas tratadas con Corifolitropina alfa.

Alumna: Paula Gómez Martínez

Tutor Académico: José Salvador Vicente Antón

Valencia, Julio 2019

Resumen: Las técnicas de reproducción asistida se emplean hoy en día de manera cotidiana tanto en humanos, por problemas reproductivos, como en animales de granja para aumentar el número de gametos o embriones obtenidos, de forma que nos permita desarrollar y estudiar modelos biomédicos para la gestión reproductiva junto con otras aplicaciones. Una de las técnicas más utilizadas en este contexto es el tratamiento de superovulación, que se basa en la estimulación ovárica para aumentar la cantidad de ovocitos obtenidos mediante el suministro de distintas hormonas. En este trabajo se emplea un tratamiento con Corifolitropina alfa (FSH-CTP), una hormona FSH recombinante que permite un aumento de su vida media en sangre, reduciendo el número de veces que se tiene que administrar la hormona. La hormona AMH es una glicoproteína que se expresa en las células de la granulosa de los folículos ováricos y que se utiliza para conocer el estado de la reserva folicular en el ovario, y algunos estudios sugieren su utilización como indicador de la respuesta ovárica.

El objetivo de este trabajo fue conocer si los niveles séricos de AMH y esteroides como el 17β -estradiol y la progesterona en la coneja pueden ser utilizados como predictores de la respuesta tras un tratamiento de superovulación.

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento de superovulación provocaba, como era de esperar, un incremento de 17β -estradiol mientras el nivel de progesterona se mantenía constante. Los niveles de progesterona sérica no se ven alterados por el tratamiento, evitando los problemas de fecundidad o la obtención de embriones morfológicamente anormales un incremento de la progesterona podría conllevar. Este efecto sí pudo ser relacionado negativamente ya que algunas conejas presentaron niveles de progesterona ligeramente altos al iniciar el tratamiento de superovulación ocasionando descensos en los ratios de embriones obtenidos (fecundidad). Por otro lado, se ha observado una correlación negativa entre los niveles de estradiol y AMH debido a una interferencia de la AMH con la enzima aromatasa, que sintetiza estradiol a partir de andrógenos. Finalmente se ha podido establecer un cluster con el ratio a tiempo 0 de progesterona/estradiol/AMH y la tasa de ovulación, permitiendo establecer una relación entre la AMH y la respuesta superovulatoria, aunque no de forma directa.

Palabras clave: AMH, superovulación, viabilidad embrionaria, conejo, corifolitropina alfa.

Title: Relationship between AMH levels and, the superovulatory response and embryo viability in rabbits treated with Corifollitropin alfa.

Abstract: Assisted reproduction techniques are commonly used nowadays in humans, because of reproductive problems, but also in farm animals, to increase the number of gametes or embryos obtained, so we are able to develop and study new biomedical models for reproductive management among other applications. One of the most used techniques in this context is the superovulation treatment, based on the ovarian stimulation to increase the amount of oocytes obtained through the supply of different hormones. In this work, a treatment with Corifollitropin alfa (FSH-CTP) is used, a recombinant FSH that allows a longer life for the hormone in blood, reducing the number of times that the hormone needs to be injected. AMH is a glycoprotein that granulosa cells express in the ovary follicles and is used to know the follicle reserve in the ovary. Some studies suggest its use as an indicator for ovarian response.

The objective of this work was, on one hand, to know if serum levels of AMH and steroids like 17β -estradiol and progesterone in female rabbits can be used as predictors of the response to a superovulation treatment.

The obtained results showed that the superovulation treatment produced, as it was predicted, an increase of the 17β -estradiol levels while progesterone levels remained constant. Serum levels of progesterone were not changed by the treatment, avoiding the problems of fecundity and recovery of morphologically abnormal embryos associated with higher levels of progesterone. This effect could be related negatively because some of the rabbits had slightly higher levels of progesterone at the beginning of the superovulation treatment, producing a decline in the obtained embryo ratios (fertility). On the other hand, it was possible to notice a negative correlation between the estradiol and AMH levels due to an interference of AMH with aromatase enzyme, which synthesizes estradiol from androgens. Finally it was possible to establish a cluster with time 0 ratio of progesterone/estradiol/AMH and ovulation ratio, establishing a relationship between AMH and superovulatory response, although not in a direct way.

Key words: AMH, superovulation, embryo viability, rabbit, corifollitropin alfa.

Títol: Relació entre els nivells de AMH i, la resposta superovulatòria i la viabilitat dels embrions en conilles tractats amb Corifolitropina alfa.

Resum: Les tècniques de reproducció assistida s'utilitzen actualment de manera quotidiana tant en humans, per problemes reproductius, com en animals de granja, per a augmentar el nombre de gamets i embrions obtinguts, de manera que ens permeta desenvolupar i estudiar models biomèdics per a la gestió reproductiva junt amb altres aplicacions. Una de les tècniques més utilitzades en aquest context és el tractament de superovulació, que es basa en l'estimulació ovàrica per a augmentar la quantitat d'ovocits obtinguts mitjançant l'administració de diferents hormones. En aquest treball s'utilitza un tractament amb Colifolitropina alfa (FSH-CTP), una hormona FSH recombinant que permet un augment de la seua vida mitjana en sang, reduint el nombre de vegades que s'ha d'administrar l'hormona. L'hormona AMH és una glicoproteïna que s'expressa a les cèl·lules de la granulosa dels fol·licles ovàrics i que s'utilitza per a conèixer l'estat de la reserva fol·licular a l'ovari i, alguns estudis suggereixen el seu ús com a indicador de la resposta ovàrica.

L'objectiu d'aquest treball va ser, d'una banda, conèixer si els nivells sèrics de AMH i esteroides com el 17β -estradiol i la progesterona en la conilla poden ser utilitzats com a predictors de la resposta tras un tractament de superovulació.

Els resultats obtinguts van mostrar que el tractament de superovulació provocava, com era d'esperar, un increment de 17β -estradiol mentre que els nivells de progesterona es mantenien constants. Els nivells de progesterona sèrica no es van veure alterats per el tractament, evitant els problemes de fecunditat o l'obtenció d'embrions morfològicament anormals que un augment de la progesterona podria provocar. Aquest efecte es va poder correlacionar negativament ja que algunes conilles presentaren nivells de progesterona lleugerament elevats al començar el tractament de superovulació, provocant un descens en els ratios de embrions obtinguts (fecunditat). D'altra banda, se ha observat una correlació negativa entre els nivells de estradiol i AMH per una interferència de la AMH amb l'enzim aromatas, que sintetitza estradiol a partir d'andrògens. Finalment, s'ha pogut establir un cluster amb el ratio a temps 0 de progesterona/estradiol/AMH i la tasa d'ovulació, permetent establir una relació entre la AMH i la resposta superovulatòria, encara que no de forma directa.

Paraules clau: AMH, superovulació, viabilitat embrionària, conill, corifolitropina alfa.

AGRADECIMIENTOS

Entre todas las personas que me han ayudado a llevar a cabo este trabajo quiero destacar a mis padres. Sin el ahorro que han ido realizando a lo largo de toda mi vida incluso en los peores momentos no habría sido posible que yo estudiara esta carrera, por lo que les estoy eternamente agradecida. Gracias a mis abuelos, Pascual y Elena, por todo el cariño y amor incondicional siempre que lo he necesitado, y a mi abuela Carmen, por ser el mejor ejemplo de mujer fuerte e independiente que nunca se rinde ante nada y que no permite que nadie lleve las riendas de su vida.

Gracias a José, mi tutor, por haber hecho un trabajo impecable con mi TFG, por ser atento, estar siempre disponible y estar hasta el último momento pendiente de que todo saliera bien. Tu dedicación y pasión hacia esta profesión es admirable. Gracias también a todos los que trabajan en el laboratorio, en especial a Amparo, por facilitarnos las cosas y resolver nuestras dudas cuando más perdidos estábamos todos los que estábamos realizando el TFG.

Gracias también a todos mis compañeros del TFG. Sin vosotros los ratos de espera habrían sido mucho más aburridos y el estrés y agobio compartidos han hecho que todo fuera mucho más sencillo.

No puedo olvidarme de las personas que han estado conmigo al pie del cañón durante cuatro años muy turbulentos, mis "biotetas": Carmen, María, Marina, Gloria, Carmen, Claudia y Nora. Gracias haberos convertido en personas imprescindibles en mi vida, por los apuntes, por las horas eternas de biblioteca, por las fiestas y por los viajes juntas. No tengo un solo recuerdo de la universidad en el que no aparezca una de vosotras. Os echaré mucho de menos.

Por último, gracias a mis amigos de toda la vida, tanto a los de Valencia como a los de Aliaguilla. A Irene, por otros 17 años juntas. Gracias por ser mi mejor amiga.

¡Muchísimas gracias!

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
	1.1 El conejo como modelo animal.....	2
	1.2 El tratamiento de superovulación.....	4
	1.3 Predicción de la respuesta superovulatoria mediante AMH.....	5
	1.3.1 AMH en humanos.....	6
	1.3.2 AMH en modelos animales.....	8
	1.4 Efecto del tratamiento de superovulación sobre la calidad ovocitaria y embrionaria.....	10
2	OBJETIVOS	11
3	MATERIALES Y MÉTODOS	12
	3.1 Diseño experimental.....	12
	3.2 Animales.....	13
	3.3 Tratamiento de superovulación e inseminación artificial.....	13
	3.4 Procedimiento experimental.....	14
	3.5 Análisis de progesterona, 17 β -estradiol y AMH en suero.....	15
	3.6 Análisis estadístico.....	17
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
5	CONCLUSIONES	22
6	BIBLIOGRAFÍA	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tendencia en el uso de las técnicas de reproducción asistida entre 1997 y 2009 en países seleccionados.

Figura 2. Estadística de producción de embriones en vacuno.

Figura 3. Esquema del proceso de foliculogénesis en ovarios humanos.

Figura 4. Esquema de secreción de la AMH por los folículos primarios y preantrales y su efecto inhibitorio sobre el crecimiento folicular inducido por FSH.

Figura 5. Aspecto de ovarios poliquísticos bilaterales en ecografía. 10 o más folículos con distribución periférica.

Figura 6. Relación entre los niveles de AMH circulantes (pg/ml) y el número de cuerpos lúteos en el día de la recolección de embriones en vacas múltipalas y primíparas.

Figura 7. Niveles de AMH (ng/ml) en función de la edad en ratones.

Figura 8. Esquema del diseño experimental. Obtención de muestras sanguíneas en hembras superovuladas para el estudio de progesterona, estradiol y AMH y su relación con la tasa ovulatoria.

Figura 9. Ovarios superovulados.

Figura 10. a) Embrión de 24 horas con dos corpúsculos polares; b) embrión de 24 horas en estadio de 2 células; c) ovocito fragmentado; d) embrión morfológicamente anormal, no viable.

Figura 11. Aspecto de las placas multipocillo pertenecientes al kit comercial de análisis de Progesterona. Aspecto antes (izquierda) y después (derecha) de añadir el sustrato del enzima conjugado.

Figura 12. Curva patrón de progesterona a tiempo 0.

Figura 13. Curva patrón de progesterona a tiempo 3.

Figura 14. Curva patrón de estradiol a tiempo 0.

Figura 15. Curva patrón de estradiol a tiempo 3.

Figura 16. Curva patrón de AMH a tiempo 0.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coeficiente de correlación entre la concentración en sangre del biomarcador (AMH) previa a la superovulación y la respuesta superovulatoria en 30 vacas Holstein lactantes.

Tabla 2. Estadísticos descriptivos empleados.

Tabla 3. Resultados de significación del test ANOVA de los niveles de estradiol y progesterona entre tiempo 0 y tiempo 3.

Tabla 4. Efecto del tratamiento de superovulación con rhFSH sobre distintos estadísticos descriptivos.

Tabla 5. Correlaciones destacadas entre los estadísticos descriptivos.

Tabla 6. Cluster para el ratio progesterona:estradiol:AMH y tasa de ovulación.

ABREVIATURAS

ART = Assisted Reproduction Techniques

AMH = Antimüllerian Hormone / Hormona anti-mülleriana

iPSCs = induced Pluripotent Stem Cells / células madre pluripotentes inducidas

FSH = hormona folículoestimulante

LH = hormona luteinizante

hCG = gonadotropina coriónica humana

eCG = gonadotropina corónica equina

CTP = péptido carboxi-terminal

FSH-CTP = corifolitropina alfa

IGF1 = factor de crecimiento insulínico 1

PGF_{2α} = prostaglandina F_{2α}

TGF-β = factor de crecimiento transformante beta

ng = nanogramos

ml = mililitro

IMC = índice de masa corporal

PII = promotor II específico de ovario para la aromatasa

SOP = síndrome de ovario poliquístico

TRA = técnicas de reproducción asistida

AFC = recuento de folículos antrales

ATP = adenosin trifosfato

DNA = ácido desoxirribonucleico

OCT4 = factor de transcripción de unión a octámeros 4

t = tiempo

UI = unidad internacional

M = molar

INTRODUCCIÓN

La aplicación de las técnicas de reproducción asistida para mejorar la eficiencia reproductiva es habitual tanto en la especie humana como en animales de laboratorio y granja por distintas causas. En nuestra especie, como consecuencia de los problemas de infertilidad o de riesgo asociados al retraso en la maternidad (Balasch y Gratacós, 2012; Kocourkova *et al.*, 2014, Figura 1), mientras que, en animales, éstas se utilizan con el fin de multiplicar la obtención de gametos y embriones para facilitar tanto el desarrollo de herramientas biotecnológicas y modelos biomédicos como para la gestión reproductiva y difusión de genotipos de interés. Por ejemplo, alrededor de un millón de embriones de vacuno se producen y transfieren al año (unos 800.000 *in vivo* y cerca de 120.000 *in vitro*, AETE, 2016, Figura 2).

Entre las técnicas reproductivas más aplicadas sobresalen los tratamientos de estimulación ovárica y su respuesta (número y calidad de los óvulos y embriones obtenidos; Gilchrist *et al.*, 2016). La respuesta a los tratamientos depende de numerosos factores, entre los que se encuentran el genotipo, la edad, el estado fisiológico, la condición corporal, la estación y, en caso de humanos, también el consumo de sustancias nocivas como el alcohol o el tabaco.

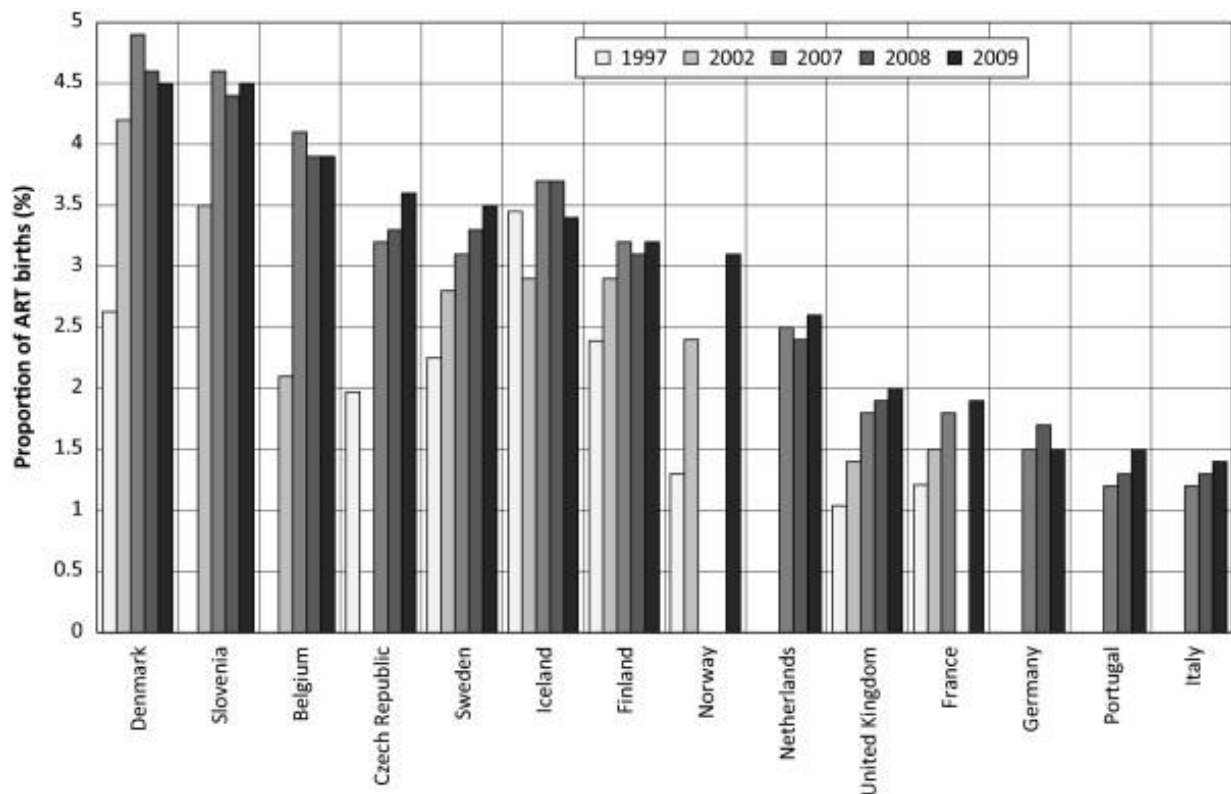


Figura 1. Tendencia en el uso de las técnicas de reproducción asistida entre 1997 y 2009 en países seleccionados (ESHRE, The Czech National ART Register; Kocourkova *et al.*, 2014).

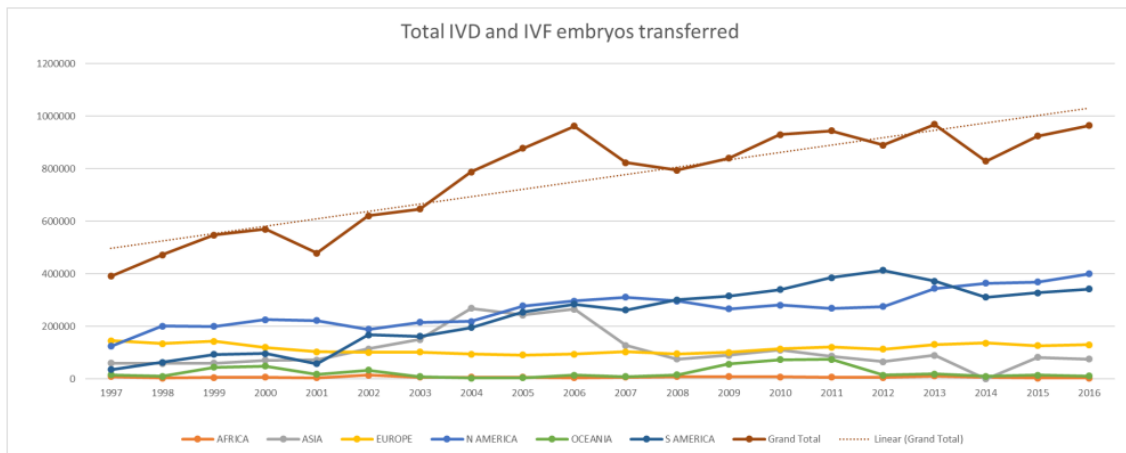


Figura 2. Estadística de producción de embriones en vacuno (IETS, 2016).

1.1 EL CONEJO COMO MODELO ANIMAL

El conejo (*Oryctolagus cuniculus*) ha sido utilizado en estudios del ámbito de la biotecnología y la medicina, desde estudios en patología (García *et al.*, 2014), oncológicos (Summa *et al.*, 2014) hasta de biología y biotecnología reproductiva (Fischer *et al.*, 2012).

En el ámbito de la reproducción ha demostrado ser un buen modelo animal para el estudio de distintos aspectos, como el envejecimiento de los ovarios y sus consecuencias (Díaz-Hernández *et al.*, 2018), la foliculogénesis (Abadjieva *et al.*, 2018), para estudiar las interacciones materno-embrionarias durante la etapa de implantación dado que, además de ser un animal de fácil manejo, es una especie de ovulación inducida y la cronología de los procesos de ovulación, fecundación e implantación pueden ser establecidos con bastante precisión. Además, ambas especies (humana y conejo) presentan desarrollos embrionarios in vitro muy similares hasta el noveno día de cultivo y muestran el mismo tipo de implantación (Hohn *et al.*, 1992; Tao y Niemann, 2000; Carver *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2012).

El conejo, al igual que el ratón, tiene una fertilidad elevada que puede incrementarse mediante el uso de tratamientos hormonales, un comportamiento sexual definido y un ciclo reproductivo corto, lo que reduce el número de animales y costes en la experimentación. La coneja es un mamífero político que no presenta ciclo estral hasta el momento en que es inducida a ovular. A diferencia de otras especies de mamíferos, la ovulación se produce no sólo como consecuencia del desarrollo folicular, sino que, además, requiere del estímulo del coito, presentando una alternancia entre fases de aceptación y no aceptación de la monta, que está relacionada con el desarrollo y la atresia de folículos pre-ovulatorios, con el aumento de los niveles de estradiol y el reflejo de lordosis característico del estado de receptividad (Lefèvre y Caillol, 1978; Enkhuizen, 1980). El desarrollo folicular y el comportamiento sexual es desencadenado por la secreción por parte del hipotálamo de GnRH y los niveles crecientes de estradiol, cuando éstos alcanzan unos niveles de estradiol de alrededor de 20 pg/ml en plasma (Orstead *et al.*, 1988), el estímulo coital, mediante una vía aferente nerviosa, produce la secreción fundamentalmente de LH que desencadenará la ovulación (Eckert, 1998), presentando a las seis horas del coito una concentración de estrógenos de alrededor de 140

pg/ml en plasma, cantidades muy superiores a las observadas en el momento de la monta. Estos niveles de estradiol se mantienen constantes a partir de este momento hasta el séptimo día de gestación, mientras que los niveles de progesterona crecerán desde valores en torno a 1ng/ml hasta situarse entre los 10-20 ng/ml entre el día sexto y séptimo de gestación (Kahn-Dawood y Dawood, 1984). En el conejo, el esperma se deposita en la zona superior de la vagina. Al igual que en otros mamíferos, la fecundación se producirá en el ámpula entre 14 y 18 horas después de la monta o inseminación (Thibault *et al.*, 1975). En todas las especies de mamífero, una vez el ovocito es fecundado, el cigoto comienza a sufrir las divisiones propias de la segmentación. Brackett *et al.* (1972) establecieron la cronología de estas divisiones in vivo, demostrando que la formación del segundo corpúsculo polar y la posterior formación de ambos pronúcleos tienen lugar alrededor de las 14-18 horas post-coito. La primera segmentación se observa entre las 21 y 25 horas, seguida de las siguientes segmentaciones con un intervalo entre ellas de alrededor de 4 y 8 horas. A partir de las 60 horas después de la fecundación, se inicia la compactación, de forma que los blastómeros más exteriores se transforman en células epiteliales prismáticas, que están unidas entre sí por medio de desmosomas (mórula). La formación de la blástula o cavidad interior del blastocisto suele observarse alrededor de las 70 horas después de la monta, momento en el que el embrión pasa al cuerno uterino, donde tendrá lugar la implantación en el séptimo día de gestación. En este período previo al proceso de adhesión, el blastocisto aumenta entre 20 y 30 veces su diámetro. Finalmente, entre los días 9 y 11 se produce una colonización del endometrio por parte de las células trofoblásticas, que proliferan para dar lugar al sincitiotrofoblasto, rompiendo la lámina basal endometrial e invadiendo los vasos sanguíneos maternos (Hadley, 1997; Hoffman *et al.*, 1998). La placenta se constituirá en torno al día 17-19 y el parto tendrá lugar en torno al día 31 desde la inducción de la ovulación.

Por otro lado, muchas de las técnicas de reproducción asistida o manipulación genómica empleadas hoy en día están ampliamente desarrolladas y se utilizan de forma rutinaria. Entre estas técnicas podríamos encontrar la superovulación para obtener óvulos y embriones, la producción de embriones mediante la técnica ICSI (Li *et al.*, 2009), el cultivo de embriones (Marshall y Carney, 2012) y su crioconservación (Marco-Jiménez *et al.*, 2016), así como la obtención de modelos Knockout o transgénicos asociados a microinyección de vectores en óvulos o embriones (Reichardt y Fischer, 2014; Nakagawa *et al.*, 2015; Kawano y Honda, 2017).

Además, desde el punto de vista genómico, en la base de datos Ensembl se puede encontrar el registro y su anotación. OryCun2 fue desarrollado por el Broad Institute para el proyecto de genoma de mamíferos en 2009 y, actualmente, el 82% de los 2.74Gb del genoma de conejo se ha podido anclar a los autosomas 1-21 y al cromosoma sexual X. En cuanto a la anotación del genoma su última actualización data de 2013 y dispone de 19.293 genes codificantes, 3.375 no codificantes y 1.001 pseudogenes identificados.

1.2 EL TRATAMIENTO DE SUPEROVULACIÓN

Los protocolos de superovulación están diseñados para asegurar el máximo número de embriones transferibles por donante y para ello se utilizan las gonadotropinas de origen hipofisario, placentario y recientemente recombinantes como la hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (hCG) y gonadotropina coriónica equina (eCG) o Corifolitropina alfa (CTP). La hormona FSH hipofisaria promueve el desarrollo de una población de folículos de entre los secundarios tardíos a antrales y sostendrá su crecimiento inicialmente (reclutamiento). Para ello los niveles de FSH deben sobrepasar un determinado umbral y, dependiendo de la especie y en condiciones normales, un folículo o unos pocos alcanzarán la fase de dominancia provocando una reducción de los niveles de FSH y la atresia del resto de folículos antrales. La atresia de los folículos reclutados es, por tanto, una consecuencia directa de su dependencia de la gonadotropina FSH, por lo que si evitamos que se reduzcan sus niveles circulantes, más folículos tendrán ocasión de alcanzar la fase de dominancia. En esta fase los factores autocrinos y paracrinos producidos por las células foliculares y el óvulo (activinas, IGF1 y estradiol) sostienen el desarrollo a folículo preovulatorio y permiten la adquisición de la competencia ovocitaria (Broekmans, 2019).

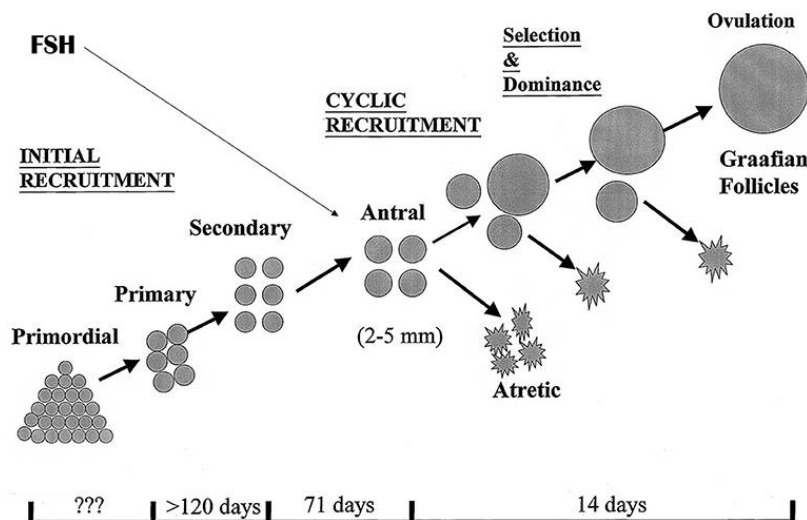


Figura 3. Esquema del proceso de foliculogénesis en ovarios humanos (Broekmans, 2019).

El uso de FSH se caracterizaba por tener una vida media corta en sangre y una rápida eliminación metabólica, siendo necesario el uso de varias inyecciones a lo largo del tratamiento. Sin embargo, el proceso se optimizó mediante el uso de una FSH recombinante de vida media larga llamada corifolitropina alfa, la cual tiene como principal ventaja la reducción del número de inyecciones y un mejor manejo por parte de las pacientes y hembras animales sometidas al tratamiento (Park *et al.*, 2013; Pouwer *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2016; Viudes-de-Castro *et al.*, 2019).

Los protocolos de superovulación se diseñan a partir de las características del ciclo sexual de cada especie, atendiendo especialmente al número, inicio y periodo de las oleadas foliculares que se suceden en cada ciclo y a los procesos de dominancia y atresia folicular. Por ejemplo, hoy en día en ganado bovino el protocolo de superovulación consiste en la administración de FSH dos veces al día durante 4 o 5 días o una sola administración con los nuevos productos

recombinantes a partir del día 8-9 desde el anterior celo, momento en el que se inicia una nueva oleada de desarrollo folicular, tras 4-6 días es posible observar un gran número de folículos pre-ovulatorios. El estro (periodo de receptividad sexual) comienza después de 36 a 48 horas tras la suspensión del tratamiento y la ovulación de 24 a 36 horas más tarde (Bo y Mapletoft, 2014). En el caso del conejo el tratamiento se restringe a las 72h (3 días) no siendo necesario sincronizar el ciclo ya que son animales de ovulación inducida. Tras estas 72 horas las conejas son inseminadas e inducidas a ovular, lo que ocurre unas 10-12 horas tras la inducción. Por el contrario, en la especie humana, el tratamiento de superovulación en donantes de óvulos o de estimulación ovárica en casos de infertilidad dura unos 8-10 días ya que su fase de desarrollo folicular es mucho más larga y característica de los primates.

Desde 2010 es posible utilizar un producto hormonal recombinante, la FSH-CTP (corifoliotropina alfa), la cual tiene una vida media en sangre superior y facilita que una sola administración cubra las necesidades de estimulación y mantenimiento folicular durante 8 días en la especie humana, 4-6 días en vacuno o los tres días de la coneja. Elonva (Merck Sharp and Dohme S.A.) es el único fármaco de este tipo aprobado para su uso en humanos (Ben-Menhamen, 2018) y Bovipure-FSH es el producto equivalente diseñado para uso en rumiantes (registro de patente US 8518881 B2).

Sin embargo, uno de los principales problemas de los procedimientos de superovulación o estimulación, es tanto la variabilidad de la respuesta como el impacto que esto puede generar sobre el desarrollo folicular, la tasa de fecundación y el desarrollo embrionario, afectando por tanto al rendimiento y a la calidad de óvulos y embriones obtenidos tras el tratamiento (Viudes-de-Castro *et al.*, 2019). Entre los problemas derivados de los tratamientos de superovulación, se encuentran la generación de folículos anormales y quísticos, el efecto sobre mecanismos epigenéticos y la expresión génica con efectos directos sobre la calidad y maduración de ovocitos, el desarrollo embrionario y el crecimiento fetal (Krisher, 2013; Uysal *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2017). Adecuar, reducir y utilizar en el momento adecuado la estimulación endocrina exógena podría ayudar evitar o paliar estos inconvenientes. Por lo que resulta especialmente interesante estudiar marcadores foliculares que permitan establecer el momento y predecir la respuesta con la finalidad individualizar los tratamientos.

1.3 PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA MEDIANTE AMH

La hormona antimülleriana (AMH) es una glicoproteína dimérica miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Cate *et al.*, 1986). La AMH se expresa en las células de la granulosa de los folículos ováricos y su expresión se ha podido observar incluso a las 36 semanas de gestación en humanos (Rajpert-De Meyts *et al.*, 1999). Las células de la granulosa de los folículos primarios muestran una expresión homogénea de AMH. En los folículos más grandes, la AMH se produce principalmente en células cercanas al ovocito y en algunas que rodean el antro. La AMH continúa expresándose en los folículos en crecimiento hasta que alcanzan un tamaño y grado de diferenciación suficiente para poder ser seleccionados para la dominancia por parte de la acción de la FSH pituitaria (La Marca y Volpe, 2006).

Los folículos primordiales y su desarrollo se ven regulados de forma positiva o negativa por distintos factores, siendo la AMH considerado un factor negativo en los primeros estudios del desarrollo folicular (La Marca y Volpe, 2006). Distintos estudios (Durlinger *et al.*, 2002; Gigli *et al.*, 2005) demostraron que en modelos animales la expresión de AMH regulaba de forma negativa la activación de los folículos primordiales y el crecimiento de los folículos preantrales. Otro estudio demostró que los folículos parecían ser más sensibles a la presencia de FSH en ausencia de AMH, utilizando modelos animales knock-out para el gen de la AMH (Durlinger *et al.*, 2001).

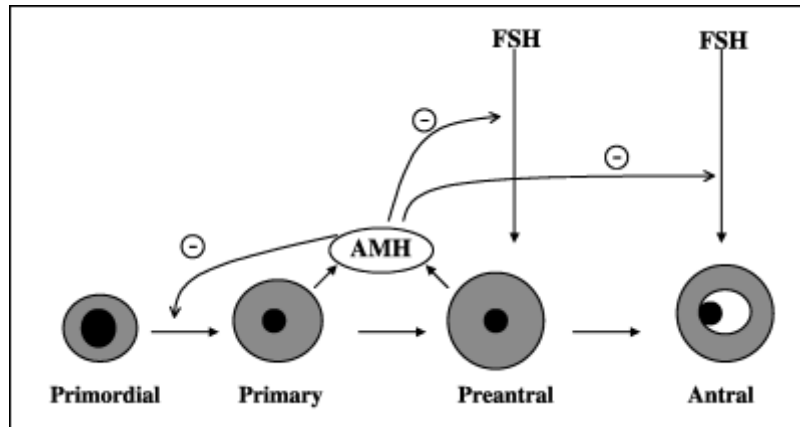


Figura 4. Esquema de secreción de la AMH por los folículos primarios y preantrales y su efecto inhibitorio sobre el crecimiento folicular inducido por FSH (La Marca y Volpe, 2006).

La AMH es secretada por el ovario a la circulación sanguínea y puede ser medida en el suero. Los niveles de AMH en suero reflejan el conjunto de folículos ováricos que hay presentes en un determinado momento, ya que son las células de los mismos las que producen esta hormona (La Marca y Volpe, 2006).

1.3.1 AMH EN HUMANOS

Para poder utilizar los niveles de AMH en sangre como marcador de la reserva ovárica es necesario determinar si se deben tener en cuenta factores como la edad, el índice de masa corporal o el historial reproductivo (si han tenido anteriormente embarazos o no). La Marca *et al.* (2012) estableció que el valor medio de AMH en suero era 3.45 ng/ml para mujeres de una media de 34 años, observando una correlación negativa con la edad. Su *et al.* (2008) determinaron que los niveles de AMH son más bajos en mujeres con obesidad en comparación con mujeres de su misma edad, aunque tengan un recuento de folículos similar. Esto sugería que los niveles de AMH sí se veían afectados por el peso de las mujeres, no siendo necesariamente una evidencia de una menor reserva ovárica.

Distintos estudios han observado el efecto de enfermedades ováricas como el síndrome de ovario poliquístico (SOP) con los niveles de AMH y las consecuencias fisiológicas para las mujeres que lo padecen (Pellatt *et al.*, 2011; Saad A. Amer *et al.*, 2013), ya que las mujeres que padecen esta condición suelen presentar unos niveles de AMH más elevados (Durlinger *et al.*, 2001; Pellatt *et al.*, 2011). El síndrome de ovario poliquístico es la principal causa de infertilidad anovulatoria (Frank *et al.*, 2000) y se estima que puede afectar a un 5% de mujeres en edad reproductiva (Nandi *et al.*, 2014). Además, es la principal causa de infertilidad en las mujeres que acuden a clínicas de reproducción asistida, estimando que afecta aproximadamente a un 70% de las pacientes (Brassard *et al.*, 2008).

Se trata de una enfermedad crónica heterogénea ya que tiene manifestaciones reproductivas, metabólicas y secuelas fisiológicas. Sus manifestaciones son distintas en función del momento del ciclo de vida en el que se encuentra la persona que lo padece. En adolescentes suele presentar manifestaciones fisiológicas que con el tiempo darán lugar a problemas de fertilidad y complicaciones metabólicas. Sin embargo, condiciones físicas como el peso de la paciente, pueden traducirse en complicaciones metabólicas como tolerancia a la insulina o diabetes mellitus (Nandi *et al.*, 2014). Debido a que las pacientes presentan de 2 a 3 veces más folículos pequeños que las personas que no padecen esta enfermedad, tienen de 2 a 3 veces más concentración de AMH en suero (Pigny *et al.*, 2003; Laven *et al.*, 2004).

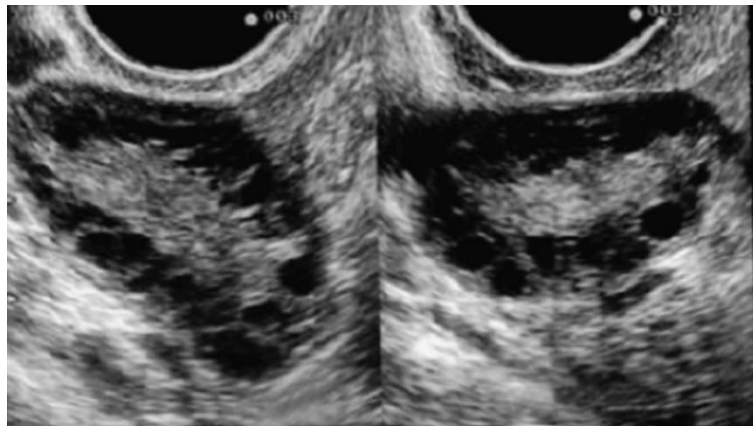


Figura 5. Aspecto de ovarios poliquísticos bilaterales en ecografía. 10 o más folículos con distribución periférica.

En mujeres con esta condición se ha estudiado el efecto de la AMH en la sensibilidad de los folículos a la FSH. Por un lado, se ha observado que el promotor II específico de ovario para la aromatasa (PII) presentaba una disminución de su actividad por parte de la AMH, lo cual reducía la actividad de la aromatasa estimulada por la FSH. Pero no era la única forma de reducir la sensibilidad a la FSH, sino que además se podía observar una disminución de la expresión del receptor de FSH. Las concentraciones de AMH significativamente superiores en mujeres con SOP pueden aumentar este efecto inhibitorio, contribuyendo al arresto folicular. Esto podría significar que las mujeres con SOP sometidas a alguna TRA podrían necesitar una dosis de FSH inicial superior (Pellatt *et al.*, 2011).

En otro estudio (Abdel Aziz *et al.*, 2017) se intentó relacionar los niveles de AMH circulante con la respuesta a la superovulación. Los resultados obtenidos dejaron patente que los niveles de AMH medidos de forma previa a la superovulación influenciaban distintos factores como: el número total de cuerpos lúteos y rendimiento total de embriones, el total de embriones transferibles y el total de embriones de grado 1.

Tabla 1

	AMH
# Corpus luteum	0.71***
Total oocyte/embryos	0.67***
Total transferable embryos	0.51***
Total grade 1 embryos	0.50*
Unfertilized oocyte/degenerate embryos	-0.18

AMH = hormona antimulleriana (ng/ml). * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.0001$.

Se ha estudiado también el uso de los niveles de AMH como medida que permita determinar la dosis de FSH recombinante a administrar en pacientes sometidas a ciclos de reproducción asistida (Lan *et al.*, 2013). Cuando una persona se somete a un tratamiento de reproducción asistida se pretende obtener un número adecuado de ovocitos que se obtienen mediante distintos protocolos, uno de los cuales es el uso de la hormona FSH recombinante para estimular la superovulación. Sin embargo, obtener la dosis adecuada para cada paciente requiere de un método sencillo y fácil de aplicar en clínica. La dosis diaria de gonadotropina administrada en reproducción asistida se suele ajustar de forma que se incrementa o se disminuye en función de la respuesta de la paciente. Sin embargo, el mayor problema es determinar la dosis de gonadotropina inicial para cada paciente, de forma que se optimice al máximo la respuesta a la vez que se minimizan los riesgos. El número total de folículos y células germinales, así como su capacidad funcional, vienen determinados por la reserva ovárica o edad ovárica, la cual afecta a la respuesta de las pacientes ante la estimulación con gonadotropinas (Lan *et al.*, 2013). Tanto la AMH como el AFC se han utilizado en diversos estudios (Younis, 2011; Sills *et al.*, 2009; La Marca *et al.*, 2012; Nelson *et al.*, 2014;) como los predictores más fiables del envejecimiento del ovario, así como predictores de la respuesta ovárica. Sin embargo, ninguno de los test que se utilizan hoy en día para la reserva ovárica puede relacionarse con una predicción del éxito del embarazo (Lan *et al.*, 2013). Sin embargo, muchos estudios se han centrado en el estudio de la reserva ovárica para personalizar los protocolos de trabajo en reproducción asistida, de forma que permita predecir una respuesta menor a la esperada (lo cual implica menores probabilidades de embarazo) o mayor (riesgo de hiperestimulación; Broer *et al.*, 2011; La Marca *et al.*, 2012).

Distintos estudios (Broer *et al.*, 2009 y 2011; Arce *et al.*, 2013; Anckaert *et al.*, 2012; Lan *et al.*, 2013) han llevado a cabo comparaciones entre AMH y AFC como predictores de la respuesta ovárica, obteniendo resultados contradictorios.

El test ideal de reserva ovárica debería ser reproducible, minimizar las variaciones intraciclo e interciclo y demostrar una alta especificidad para minimizar el riesgo de diagnósticos erróneos de disminución de reserva ovárica e identificar de forma robusta aquellas pacientes en riesgo de desarrollar síndrome de hiperestimulación ovárica de forma previa los tratamientos. Debido a que no hay hoy en día un test idóneo para la reserva ovárica, tanto AFC como AMH siguen utilizándose. Sin embargo, el hecho de poder obtener muestras en cualquier momento, tener valores específicos de la edad, plataformas automatizadas y una estandarización potencial hacen que los ensayos con AMH sean los más utilizados para la evaluación de la reserva ovárica en muchas mujeres (Tal y Seifer, 2017).

1.3.2 AMH EN MODELOS ANIMALES

La AMH se ha utilizado en distintas especies para predecir la respuesta ovárica de las hembras, dando muy buenos resultados. En cabras se ha demostrado que los niveles de AMH circulantes pueden ser un buen predictor para saber si una donante puede aportar más o menos embriones de alta calidad, pudiendo medirse las concentraciones de AMH en una única muestra de sangre tomada durante la temporada de cría o el anestro (fase del ciclo sexual correspondiente a un periodo de reposo) (Monniaux *et al.*, 2011).

En otras especies, como el ratón, se ha estudiado su capacidad de predicción de la respuesta superovulatoria en otras condiciones, como podría ser una previa administración de un

tratamiento de quimioterapia. Se llevó a cabo un estudio con ratones tratados ciclofosfamida (CTX), en el cual presentaban una disminución de la cantidad de folículos desarrollados y, como consecuencia, una disminución de la AMH. Con los niveles de AMH y FSH se estudió la función ovárica residual, determinando que los niveles de AMH servían como marcador para estudiar de forma cuantitativa la función residual y los niveles de FSH como marcador cualitativo (Detti *et al.*, 2013). En vacuno también se han utilizado estos niveles para identificar animales que podrían tener una respuesta al tratamiento de superovulación superior, además de saber cuáles son los mejores donantes de ovocitos para la producción de embriones *in vitro*. Además, en esta especie han podido correlacionar positivamente los niveles de AMH al nacimiento como una mayor fertilidad durante la etapa adulta (Baruselli *et al.*, 2015).

Los niveles de AMH no solo son variables entre estados fisiológicos sino además entre razas y especies (Kevenaar *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2015). En vacas se puede observar que las medidas de los niveles de AMH dan resultados de hasta 400 pg/mL, en cerdas hasta 3-4 ng/ml, mientras que en ratones los resultados obtenidos alcanzan los 35 ng/ml.

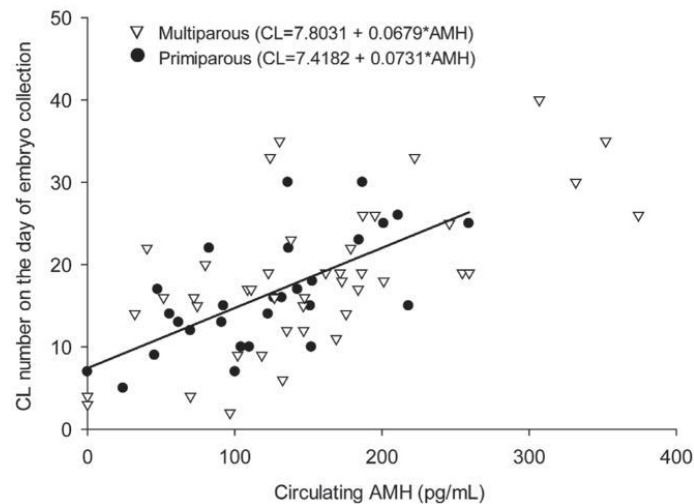


Figura 6. Relación entre los niveles de AMH circulantes (pg/ml) y el número de cuerpos lúteos en el día de la recolección de embriones en vacas múltipalas y primíparas (Baruselli *et al.*, 2015)

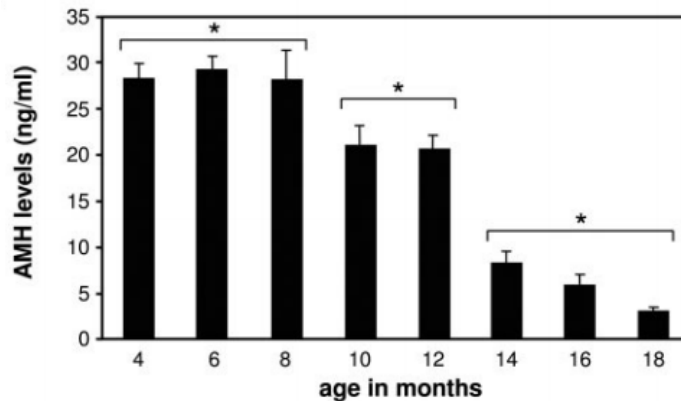


Figura 7. Niveles de AMH (ng/ml) en función de la edad en ratones (Kevenaar *et al.* 2006).

Como se puede observar en la Figura 6, dentro de la propia especie de ratón hay además una clara disminución de los niveles de AMH circulantes conforme la edad de los ratones va avanzando, demostrando que al disminuir la reserva ovárica disminuyen también los niveles de AMH circulante (Kevenaar *et al.* 2006).

1.4 EFECTOS DEL TRATAMIENTO DE SUPEROVULACIÓN SOBRE LA CALIDAD OVOCITARIA Y EMBRIONARIA

Aunque la superovulación es una herramienta útil y extensamente utilizada, distintos estudios han demostrado que puede tener efectos secundarios sobre los ovocitos y embriones, ya que los resultados obtenidos a partir de estos procedimientos suelen fluctuar. Para estudiar la calidad de ambos se han utilizado distintas variables, como puede ser el nivel de ATP en los ovocitos recuperados tras un tratamiento de superovulación. Algunos estudios han determinado que los niveles de ATP podrían tener un papel en el desarrollo y maduración de los ovocitos (Nagano *et al.*, 2006), siendo menores estos niveles en aquellos ovocitos obtenidos de animales sometidos a superovulación. Estos niveles de ATP pueden variar en función del tratamiento utilizado y aumentan si se cultivan los ovocitos a temperaturas relativamente elevadas (38.5°C). Esto sugiere que esta disminución de la producción de ATP por parte de las mitocondrias del ovocito se debe a una adaptación al estrés al que se ven sometidos en el proceso de superovulación (Cortell *et al.*, 2015).

Otros estudios se han centrado en las consecuencias a nivel epigenómico del tratamiento. Se han observado cambios a nivel de metilación del DNA (Khoueiry *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2007), así como un aumento en la acetilación de las histonas (Huffman *et al.*, 2015). Un ejemplo de las consecuencias que estos efectos podrían tener, sería la mayor incidencia del síndrome Beckwith-Wiedemann, un desorden de la impronta genómica que se ha visto incrementado en niños concebidos mediante técnicas de reproducción asistida (Marshall y Rivera, 2018). En general, los cambios epigenéticos conllevan una desregulación de la expresión de los genes, la cual se ha podido observar por ejemplo en los primeros estadios de blastocisto (Huffman *et al.*, 2015). Además, se ha observado una disminución en la proporción de ovocitos maduros en algunos experimentos, así como alteraciones de ultraestructuras de la mitocondria y complejos lisosomales, que conllevaban un aumento del número de mitocondrias vacuoladas y cuerpos vesiculares (Lee *et al.*, 2017). Una distribución alterada de los orgánulos celulares, así como una desregulación de la transcripción del gen OCT4 podrían estar asociados con un menor desarrollo en los estadios tempranos del embrión tras ciclos consecutivos de superovulación (Kalthur *et al.*, 2016). Como consecuencias adicionales, se ha podido observar en algunos estudios que el tratamiento de superovulación puede conllevar una disminución en el peso del feto, pudiéndose ver afectados tanto el crecimiento del feto como la vasculogénesis de la placenta (Weinerman *et al.*, 2017).

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este Trabajo Final de Grado son los siguientes:

- Determinar si existe una relación entre los niveles de AMH séricos y la respuesta al tratamiento de superovulación en conejos.
- Determinar si existe una relación entre los niveles de AMH séricos y la viabilidad de los embriones obtenidos tras la superovulación en conejos.
- Conocer posibles correlaciones entre los niveles de AMH séricos y los niveles de 17β -estradiol y progesterona presentes y los parámetros de respuesta al tratamiento de superovulación como las tasas de ovulación, recuperación y fecundidad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

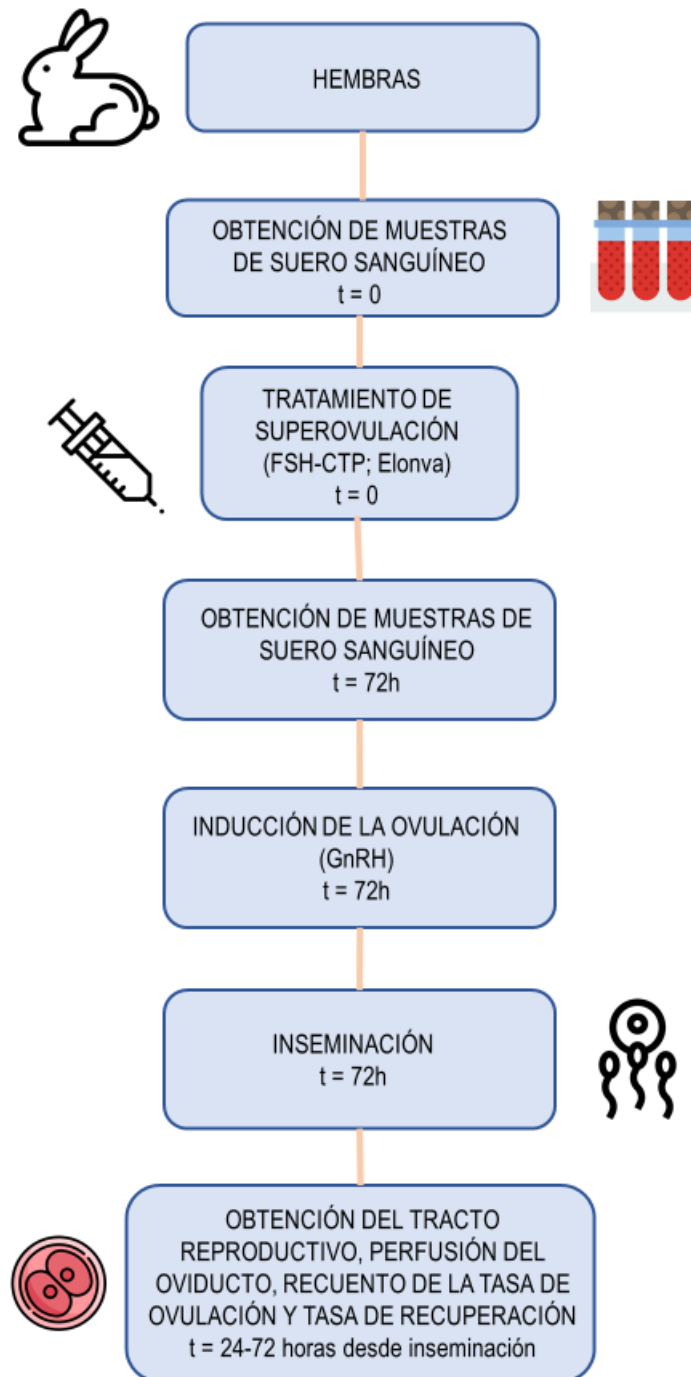


Figura 8. Esquema del diseño experimental. Obtención de muestras sanguíneas en hembras superovuladas para el estudio de progesterona, estradiol y AMH y su relación con la tasa ovulatoria.

3.2 ANIMALES

Los animales utilizados en este estudio provienen de la granja cunícola de la Universidad Politécnica de Valencia con número de registro ES462500001091. Se emplearon 41 conejas de origen California de 4,5 a 5 meses de edad y machos fértiles de la misma procedencia de más 8 meses de edad. Los conejos se encontraban alojados en jaulas convencionales (700 x 500 x 320 mm), con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, una temperatura media mínima de 17°C y máxima de 25°C y, agua y alimentación ad libitum con una dieta comercial.

Todas las actividades que implican experimentación con animales fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Politécnica de Valencia (2018/VSC/PEA/0116) y de acuerdo a la legislación vigente aplicable (Real Decreto 53/2013, Ley 32/2007 y Orden ECC/566/2015).

3.3 TRATAMIENTO DE SUPEROVULACIÓN E INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

El tratamiento de superovulación utilizado consistía en la administración en una sola dosis por vía subcutánea de 0,75 µg de FSH-CTP (corifolitropina alfa, FSH-CTP, Elonva, Merck Sharp and Dohme B.V.) y 1,4 U.I de hCG (gonadotropina coriónica humana, Coriogan Laboratorios Ovejero) por Kg de coneja. Antes de realizar el tratamiento las conejas fueron pesadas y tratadas con un relajante muscular (4mg/kg hidrocloreuro de xilacina, Xilagesic, Calier) para proceder a obtener una muestra de sangre periférica de la arteria central de la oreja que denominaremos tiempo 0.

Tras 72h las conejas fueron de nuevo tratadas con un relajante muscular y obtenida una muestra de sangre periférica de la arteria central de la oreja (tiempo 3). Las conejas fueron 10-20 min después inseminadas con 0,5 mL y 20 millones de espermatozoides de una mezcla heteroespérmica a partir de 3-4 eyaculados de machos de la misma línea no emparentados.

Los eyaculados se recuperaron mediante vagina artificial el mismo día de la inseminación. Cada eyaculado se diluyó 1:5 en Tris-Cítrico-Glucosa [0'25 M Tris (hidroximetil) aminometano, 83 mM ácido cítrico, 47 mM Glucosa] para analizar sus parámetros de movilidad, porcentaje de anomalías y concentración. La movilidad se evaluó tomando una alícuota de la mezcla de eyaculados y depositándola en una cámara Makler atemperada a 37°C para su análisis. Para valorar la concentración, se tomó otra alícuota y se fijó siguiendo el protocolo descrito por Pursel and Johnson (1974) mediante una dilución 1:10 con glutaraldehído (Glutaraldehído al 2% en solución tamponada fosfato). La determinación del número de espermatozoides por mililitro se realizó por recuento en una cámara de Thoma. A partir de esta muestra de semen fijada con glutaraldehído, se observó la morfología espermática mediante el recuento de al menos 100 espermatozoides. El resultado se expresó en porcentaje, reflejando el número de espermatozoides morfológicamente anormales. Las observaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente empleando un microscopio óptico de contraste de fases a 400X.

En cada una de las 8 sesiones, se utilizaron tres eyaculados para constituir la mezcla heteroespérmica, con una motilidad espermática superior al 70% y un porcentaje de espermatozoides anormales inferior al 25%.

Tras la inseminación, se indujo la ovulación de las conejas con 1 µg de acetato de buserilina (análogo sintético de la hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH).

3.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Las hembras fueron sacrificadas por previo aturdimiento por electronarcosis de bajo voltaje (49V y 179 Hz) 24 horas post inseminación. Los embriones se recuperaron a temperatura ambiente mediante la perfusión de los oviductos y el primer tramo del cuerno del útero con 10 mL de medio de recuperación que consistía en una solución tampón fosfato de Dulbecco suplementado con 0,2% (p/v) de albúmina sérica bovina y antibiótico (100 µg/ml dihidroestreptomina sulfato y 100 UI /ml de bencilpenicilina procaina, Penivet Suspensión, Sicasa-Farmavic S.A.). La perfusión o lavado oviductal fue recogido en una placa P60 para su observación bajo lupa.



Figura 9. Ovarios superovulados.

Se registró tanto la tasa de ovulación como el número de folículos con cicatriz de ovulación (Figura 6) como el número óvulos y embriones recuperados, realizando tanto el recuento como la catalogación bajo lupa binocular a 40x. Los embriones fueron catalogados en función de su estadio y la morfología de los mismos. Los embriones de 24 horas debían haber realizado la primera división celular o debían presentar un citoplasma homogéneo con 2 pronúcleos y haber expulsado el 2º corpúsculo polar, presentando una zona pelúcida intacta y esférica (Figura 7).

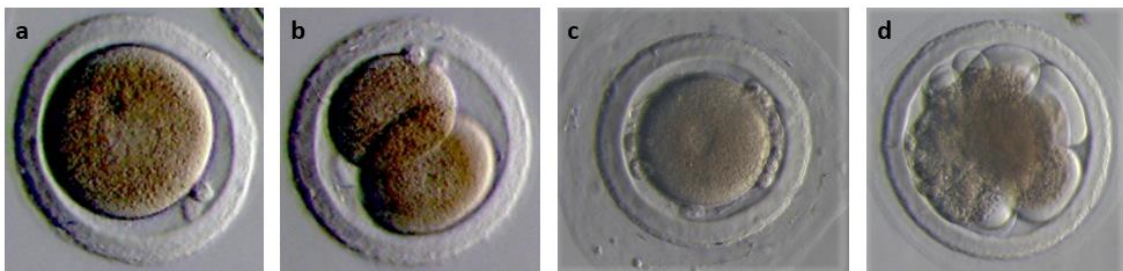


Figura 10. a) Embrión de 24 horas con dos corpúsculos polares; b) embrión de 24 horas en estadio de 2 células; c) ovocito fragmentado; d) embrión morfológicamente anormal, no viable.

De esta forma obtenemos los parámetros: tasa de ovulación (mediante el recuento manual de las cicatrices en el ovario), tasa de recuperación (ratio del número total de embriones y ovocitos recuperados respecto a la tasa de ovulación), tasa de fecundidad (ratio embriones/total recuperado) y tasa de normalidad (ratio embriones morfológicamente normales/total embriones).

3.5 ANÁLISIS DE PROGESTERONA, 17 β -ESTRADIOL Y AMH EN SUERO

La sangre obtenida a tiempo 0 y 3 de cada una de las 41 conejas se recuperó en un tubo para separación de suero (SST). La sangre se centrifugó a 3000g y 4°C durante 10 minutos con el fin de separar el suero, que se guardó a -80°C hasta su utilización. Los niveles séricos de progesterona (esteroide C21, preg-4-ene-3,20-diona), 17 β -estradiol y AMH se determinaron mediante la técnica de ensayo directo inmunoenzimático (ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante (Progesterone Elisa Kit EIA-1561; Estradiol Elisa Sensitive Kit EIA-4399; Anti-Müllerian Hormone (AMH) ELISA Kit EIA-6053 de DRG International). La sensibilidad de cada uno de ellos fue de 0,1 ng/ml para progesterona, 1,4 pg/ml para 17 β -estradiol y de 0,1 ng/ml para AMH. En el caso de la progesterona y el estradiol, se midieron los niveles tanto a tiempo 0 (antes de administrar el tratamiento de superovulación) como a tiempo 3 (al inducir la ovulación), mientras que los niveles de AMH se midieron a tiempo 0. Basándose en la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), los pocillos de las placas que se suministran con el kit vienen recubiertos de un anticuerpo policlonal dirigido contra una porción antigénica de la progesterona y 17 β -estradiol, y con un anticuerpo monoclonal dirigido a la porción antigénica de la AMH. La hormona presente en el suero sanguíneo compite con un conjugado hormona-peroxidasa de rábano en la unión al anticuerpo inmovilizado en los pocillos. Tras la incubación, el conjugado no unido se lava y al hacer la lectura de las muestras, la cantidad de conjugado de hormona unido es inversamente proporcional a la concentración de la hormona en la muestra. Después de la adición de la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de hormona en la muestra del paciente.

Los 3 kits presentaban tiempos de incubación distintos una vez adicionado el enzima conjugado a las muestras. En el caso de kit de progesterona el tiempo de incubación era de 60 minutos y, en el caso del estradiol, de 4 horas, ambos a temperatura ambiente. En el caso del kit de AMH el tiempo de incubación es más prolongado de lo habitual, en concreto, entre 18 y 20 horas de incubación. Una vez pasados los distintos tiempos de incubación, se adicionó una solución conocida como Stop que interrumpía la reacción enzimática del enzima conjugado y se leyó la absorbancia a 450 nm de forma inmediata. En el caso de las lecturas de los niveles de AMH, se hacía una primera lectura a 450 nm y una segunda a 650. Los niveles de AMH a partir de la absorbancia se medían realizando la media entre estas dos medidas corregidas y la curva de calibrado obtenida. Los kits proporcionaban una serie de controles y estándares preparados previamente para poder obtener una curva de calibrado que permitiera obtener los niveles séricos de cada una de las hormonas. La lectura de la absorbancia en las placas se llevó a cabo mediante el lector 1420 Multilabel Plate Counter VICTOR3V.

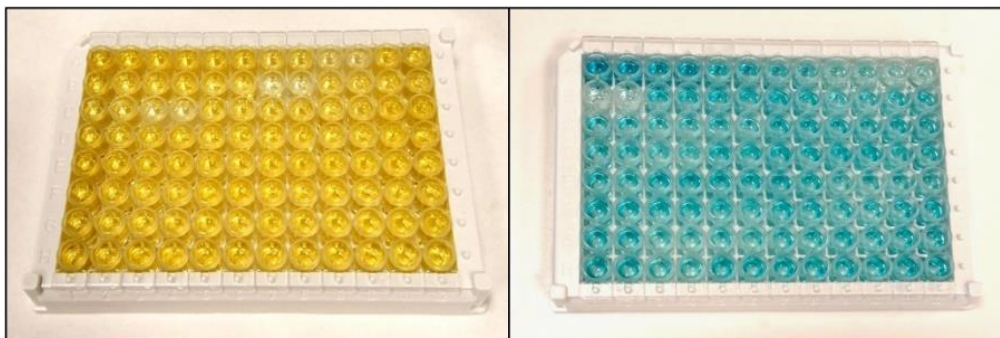


Figura 11. Aspecto de las placas multipocillo pertenecientes al kit comercial de análisis de Progesterona. Aspecto antes (izquierda) y después (derecha) de añadir el sustrato del enzima conjugado.

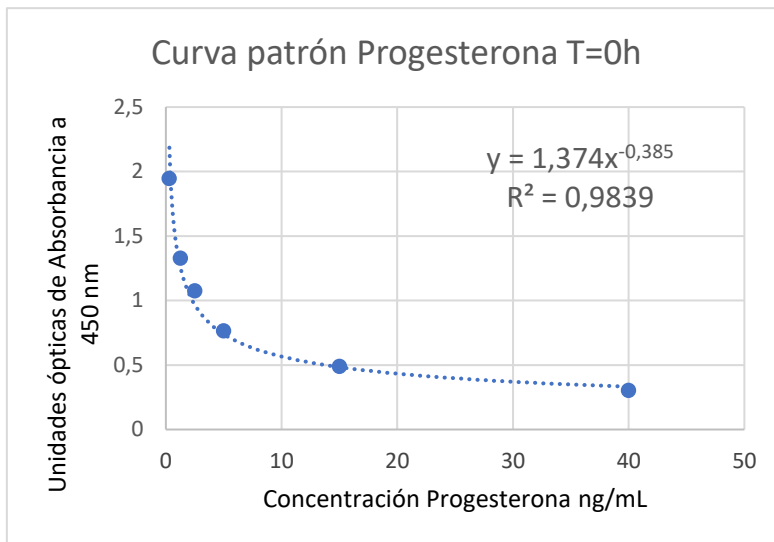


Figura 12. Curva patrón de progesterona a tiempo 0.

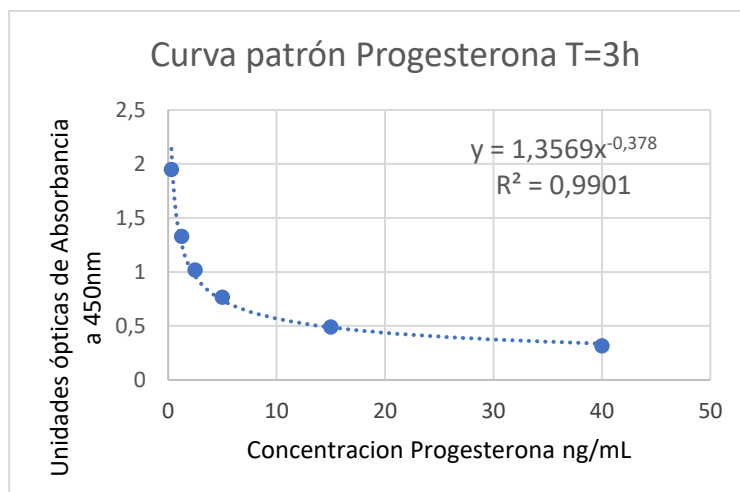


Figura 13. Curva patrón de progesterona a tiempo 3.

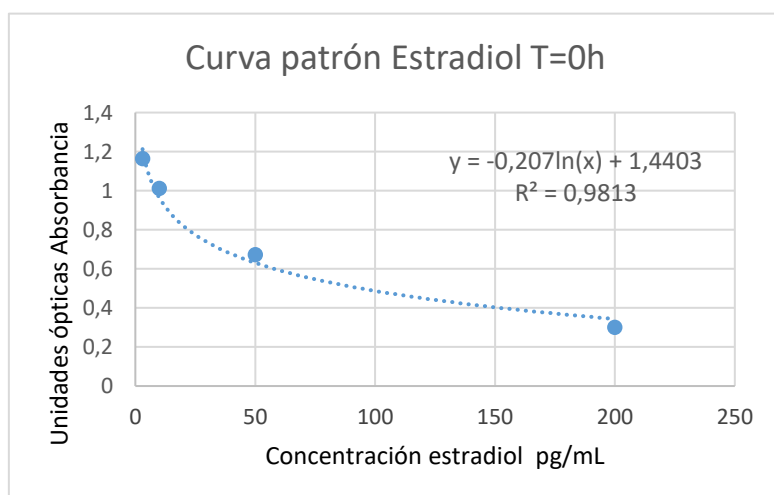


Figura 14. Curva patrón de estradiol a tiempo 0.

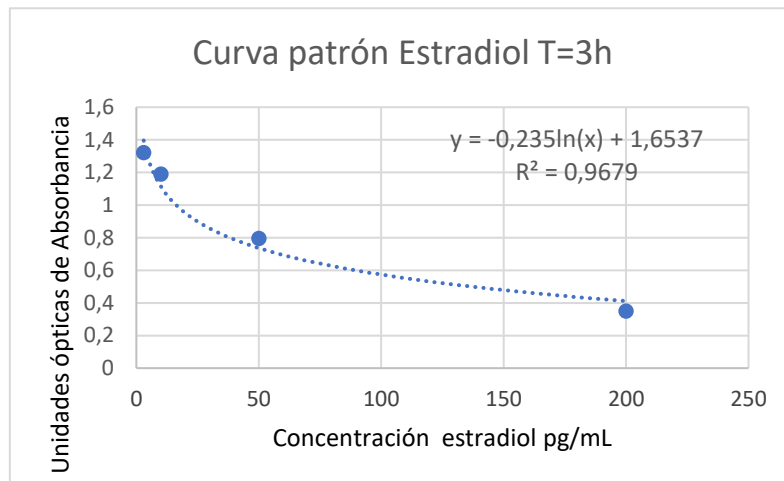


Figura 15. Curva patrón de estradiol a tiempo 3.

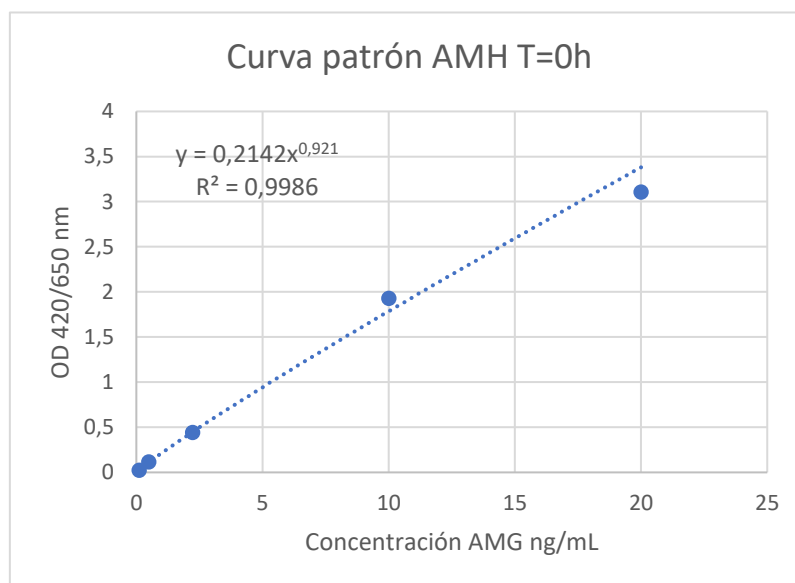


Figura 16. Curva patrón de AMH a tiempo 0.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el software IBM SPSS 16.0 (SPSS Inc; Chicago, Illinois, USA, 2002). Se realizó un análisis descriptivo de las variables evaluadas y se realizó un análisis de correlación de Pearson. Por último, se realizó tanto un análisis de la varianza de los niveles de estradiol y progesterona a tiempo 0 y 3 para evaluar el efecto del tratamiento de superovulación como un análisis de cluster entre las variables AMH y tasa de ovulación y, entre los ratios progesterona/estradiol a tiempo cero y progesterona/estradiol/AMH a tiempo cero y tasa de ovulación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 2. Estadísticos descriptivos empleados.

	N	Media	
		Estadístico	Error estándar
Tasa de ovulación	41	60,9	3,921
Tasa de recuperación	41	54,27	3,786
Eficiencia de recuperación	41	88,42	2,387
Fecundidad	41	94,36	2,591
Normalidad	41	90,8	2,918
Progesterona t0 (ng/mL)	41	1,35	0,109
Estradiol t0 (pg/mL)	41	18,57	2,055
Progesterona t3 (ng/mL)	41	1,66	0,252
Estradiol t3 (pg/mL)	41	52,38	8,299
AMH (ng/mL)	40	18,8	0,917
Ratio P/E t0	41	100,54	12,061
Ratio P/E t3	41	49,77	6,518
Ratio P/E/AMH t0	40	6,19	0,921
Peso (kg)	41	4,47	0,073

Tabla 3. Resultados de significación del test ANOVA de los niveles de estradiol y progesterona entre tiempo 0 y tiempo 3.

	Estradiol (pg/mL)	Progesterona (ng/mL)
t0	18,6 ± 13,16 ^b	1,3 ± 0,70
t3	52,4 ± 53,14 ^a	1,7 ± 1,62

Valores en las columnas con diferente superíndice difieren estadísticamente $p < 0,05$

Según podemos observar en la Tabla 3 la tasa de ovulación media obtenida por el tratamiento de superovulación es de alrededor de 60 óvulos por hembra, resultado similar al obtenido en otros trabajos en los cuales se ha utilizado el mismo tratamiento de superovulación mediante FSH-CTP (Pérez, 2018) y superior a los obtenidos en otros trabajos en los que se usaba otro tipo de FSH (Salveti *et al.*, 2007; Viudes-de-Castro *et al.*, 2009; Herreros, 2014; Mas, 2015).

En cuanto a la tasa de recuperación y de fecundidad, son similares e incluso ligeramente superiores a las obtenidas en otros trabajos en los que se ha empleado el mismo tratamiento de superovulación, así como la tasa de normalidad (Viudes-de-Castro *et al.*, 2017).

Tabla 4. Efecto del tratamiento de superovulación con rhFSH sobre distintos estadísticos descriptivos (Viudes-de-Castro et al. 2009).

Group	Number of does	RR	OR	TR	NE	AE	OO	NR	AR
rhFSH alone	29	84.94 ± 5.0	20.24 ± 1.62 ^a	17.21 ± 1.73 ^a	15.38 ± 1.77 ^a	0.21 ± 0.06	1.62 ± 0.5	98.96 ± 0.6	11.7 ± 4.1
rhFSH + 5% rhLH	24	88.42 ± 5.5	18.46 ± 1.78 ^a	16.89 ± 1.90 ^a	15.89 ± 1.95 ^a	0.04 ± 0.07	0.96 ± 0.6	99.87 ± 0.7	11.0 ± 4.6
rhFSH + 10% rhLH	29	77.17 ± 5.0	18.41 ± 1.62 ^a	14.31 ± 1.73 ^a	13.66 ± 1.77 ^a	0.07 ± 0.06	0.59 ± 0.5	99.63 ± 0.6	4.6 ± 4.1
Control	28	74.20 ± 5.2	10.56 ± 1.68 ^b	7.67 ± 1.79 ^b	7.33 ± 1.82 ^b	0.11 ± 0.06	0.22 ± 0.6	97.55 ± 0.6	6.1 ± 4.2

RR, ratio de recuperación; OR, ratio de ovulación; TR, embriones normales + embriones anormales + ovocitos; NE, embriones normales; AE, embriones anormales; OO, ovocitos; NR, ratio de normalidad (embriones normales/embriones totales); AR, ratio de anormalidad (ovocitos + embriones anormales/embriones totales + ovocitos). Valores con distinto superíndice en la misma columna indican una diferencia estadística significativa ($p < 0,05$).

Las concentraciones de estradiol y progesterona media en el suero previo al tratamiento se sitúan en niveles habituales para esta especie (Kahn-Dawood y Dawood, 1984; Orstead *et al.*, 1988). Sin embargo, en ciertas hembras los niveles de progesterona pueden ser más elevados de lo habitual y, como se observa posteriormente en la tabla de correlaciones, estos niveles superiores de progesterona pueden derivar en alteraciones en los patrones de desarrollo del epitelio oviductal y endometrio y, consecuentemente, en su actividad ciliar, lo cual puede dificultar tanto la capacitación como el transporte de los espermatozoides (Guidobaldi *et al.*, 2008).

El análisis de los niveles de estrógenos (17 β -estradiol) y progesterona tras las 72 horas de la estimulación con FSH-CTP + hCG (Tabla 4), indican que los niveles de progesterona a tiempo 3 no tienen una variación significativa con respecto a los niveles de progesterona a tiempo 0, lo que pone de manifiesto que el tratamiento no produce una luteinización de los folículos, efecto que es posible cuando se aplica en el tratamiento la hormona hCG (con actividad LH) o eCG. En este estudio, la utilización de un suplemento de hCG (7UI por coneja) solo perseguía mejorar el desarrollo folicular y la maduración ovocitaria de los embriones. Esta dosis ya fue estudiada por Viudes-de-Castro *et al.* (2019) observando una mejora en la respuesta ovulatoria y viabilidad embrionaria, no obstante, no analizó los efectos que tenía sobre los patrones de secreción de esteroides como el 17 β -estradiol y la progesterona.

Como puede observarse en la Tabla 2, los niveles de progesterona se mantuvieron estables en relación con el tiempo 0 y el nivel de 17 β -estradiol subió significativamente como consecuencia del desarrollo folicular desencadenado por el tratamiento (18,6 pg/mL vs 52,4 pg/mL) (Broekmans, 2019). El resultado de este incremento de estradiol es el descenso de la relación progesterona/estradiol. La luteinización (incremento de la secreción folicular de progesterona), podría conllevar problemas, como se ha mencionado anteriormente, en la actividad oviductal y uterina y en las funciones asociadas a ellas con efectos negativo sobre la producción y desarrollo embrionarios (Lawrenz *et al.*, 2018).

En cuanto a los niveles de AMH observados, no es posible establecer una referencia debido a que no hay trabajos anteriormente publicados en conejas. Los niveles observados en conejas nulíparas son del orden de los detectados en ratones al inicio de su etapa reproductiva (20-30 ng/mL), valor que desciende hasta los 5 ng/mL tras 18 meses de vida (Kevenaar *et al.*, 2016). En otras especies, incluida la humana, los valores observados en adultos oscilan entre los

0,5 ng/mL de vacas hasta los 3-4 ng/mL en cerdas, siendo los valores en humana entre 0,90-9,50 ng/mL (Clínica Mayo). En machos hay trabajos en los que, mediante inmunohistoquímica, se ha detectado la secreción de AMH en el parénquima testicular de conejos. Sin embargo, no se ha llevado a cabo la cuantificación del nivel en suero de esta proteína de la superfamilia TFG-β (Banco *et al.*, 2016).

Tabla 5. Correlaciones destacadas entre los estadísticos descriptivos.

Estadístico 1	Estadístico 2	Correlación de Pearson	Significación (bilateral)	N
TO	TR	0,932**	0,000	41
TR	Eficiencia REC	0,427**	0,005	41
Progesterona t0	Ratio P/E t0	0,606**	0,000	41
Estradiol t0	Ratio P/E t0	-0,525**	0,000	41
Progesterona t3	Ratio P/E t3	0,745**	0,000	41
Estradiol t3	Ratio P/E t3	-0,437**	0,004	41
Estradiol t3	Eficiencia REC	0,313*	0,047	41
Ratio P/E t0	Fecundidad	-0,536**	0,000	41
Ratio P/E t0	Normalidad	-0,434**	0,005	41
Estradiol t0	AMH	-0,323*	0,042	40
AMH	TO	-0,006	0,973	40
AMH	TR	0,079	0,630	40
AMH	Fecundidad	0,048	0,770	40
AMH	Normalidad	-0,059	0,716	40

*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

**.. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

En cuanto a los análisis de correlación, algunos son evidentes: correlación entre la tasa de ovulación y la tasa de recuperación, correlación entre la tasa de recuperación y la eficiencia de recuperación o las correlaciones entre los niveles de progesterona y estradiol y los ratios Progesterona/Estradiol en los distintos tiempos, ya que cuanto más elevados sean los niveles de progesterona o estradiol variarán los ratios que conforman.

Existe una correlación positiva entre los niveles de estradiol y la eficiencia de recuperación. Como ya se ha mencionado en el apartado de introducción, el estradiol, junto a otros factores paracrinos y autocrinos, sostiene el desarrollo a foliculo preovulatorio y permite la adquisición de la competencia ovocitaria (Broekmans, 2019). Por tanto, niveles más elevados de estradiol tendremos un mayor desarrollo folicular y a mayor número de folículos desarrollados tendremos una mayor cantidad de embriones recuperados.

Otra correlación destacable sería la del ratio progesterona/estradiol a tiempo 0 de forma negativa con la fecundidad y la normalidad. Un ratio más elevado supondría una mayor cantidad de progesterona y una menor cantidad de estradiol, condiciones en las que se daría un ambiente menos favorable para la capacitación y transporte de los espermatozoides debido a las secreciones del útero y el oviducto. Al recuperar los embriones mediante una perfusión del oviducto, el transporte de los embriones no se ve afectado por este ratio P/E. Sin embargo, aunque tenemos la misma cantidad de embriones, son de peor calidad. Junto a esta correlación se puede explicar la correlación negativa existente entre la progesterona a tiempo 0 y la fecundidad, por las mismas razones anteriormente explicadas.

Una correlación destacable sería la que presentan los niveles de estradiol y de AMH de forma negativa, la cual ya se ha podido observar en otros trabajos (Dewailly *et al.*, 2016). Esta

correlación negativa se debe a una interacción de la AMH con la enzima aromatasa. Esta enzima lleva a cabo la síntesis de estradiol a partir de andrógenos en las células de la granulosa. Al interferir la AMH con la enzima los niveles de estradiol se ven disminuidos, por lo que están relacionadas de forma negativa.

Cabe destacar que, a diferencia de en otros trabajos realizados en especies diferentes (Souza *et al.*, 2015; Akbarinejad *et al.*, 2018; Mossa y Ireland, 2019), no se ha podido observar una correlación entre los niveles de AMH, la tasa de ovulación, la tasa de recuperación, la fecundidad y la normalidad. La AMH parece ser un buen indicador de las reservas foliculares, aspecto que habrá que evaluar en el conejo, realizando estos mismos análisis sobre conejas adultas con un largo historial reproductivo (de 6 a 12 partos). Otro punto a ser tenido en cuenta es la posibilidad de que esté relacionado con el potencial reproductivo de la coneja, objetivo que sería de gran valor en producción animal y que, por tanto, también debe ser considerado en posteriores estudios.

Tabla 6. Cluster para el ratio progesterona:estradiol:AMH y tasa de ovulación.

Cluster	Conejas	Ratio P/E/AMH Media \pm es	TO Media \pm es
1	10	9,2 \pm 1,77 ^a	95,0 \pm 5,09 ^a
2	30	5,2 \pm 1,02 ^b	49,9 \pm 2,94 ^b

Valores en las columnas con diferente superíndice difieren estadísticamente $p < 0,05$

Se han propuesto distintos clusters para intentar establecer una relación entre la tasa de fecundidad/normalidad y los niveles de AMH, así como entre los niveles de progesterona, estradiol y AMH. Se estudiaron tanto el ratio P/E a tiempo 0 como el ratio combinado P/E/AMH a tiempo 0 frente a la tasa de ovulación. Aquellos clusters en los que participan únicamente el ratio P/E a tiempo 0 o la AMH no dan lugar a ningún cluster significativo que se pueda relacionar con la tasa de fecundidad o normalidad. Por el contrario, sí es posible establecer un cluster con 2 niveles para el ratio a tiempo 0 de P/E/AMH. Como se puede observar en la Tabla 6, cuanto mayor es el ratio, mayor es la tasa de ovulación. Esto se debe a unos niveles inferiores de progesterona y superiores de estradiol y AMH. Cabe destacar que, en conejas jóvenes, con altos niveles de AMH, aquellas que tienen unos niveles de AMH ligeramente inferiores, responden mejor al tratamiento de superovulación. La AMH actúa inicialmente evitando el desarrollo folicular prematuro a partir de la reserva de folículos primarios, pudiendo estos niveles iniciales altos de AMH reducir la población de folículos secundarios tardíos que podrían ser estimulados por el tratamiento de FSH-CTP.

5. CONCLUSIONES

- No ha sido posible establecer una correlación directa entre el nivel sérico de AMH y la respuesta al tratamiento de superovulación y la producción de embriones viables.
- El tratamiento de superovulación no incrementa los niveles de progesterona sérica, por lo que no conlleva los problemas asociados a ésta (fallos de fecundidad, embriones morfológicamente anormales, etc).
- Existe una correlación negativa entre los niveles de estradiol y de AMH, debido a la interferencia de la AMH con la enzima aromatasa, que sintetiza estradiol a partir de andrógenos.
- Es posible establecer un cluster con el ratio a tiempo 0 P/E/AMH que se puede relacionar con la tasa de ovulación.

6. BIBLIOGRAFÍA:

Abadjieva, D.; Petkova, M.; Grigorova, S.; Kistanova, E. (2018). Iodine supplementation activates folliculogenesis in rabbit ovary. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, Vol. 21, No. 3 (2018), 559–566.

Abdel Aziz, R.L.; Khalil, A.A.Y.; Abdel-Wahab, A.; Hassan, N.Y.; Abdel-Hamied, E.; Kasimanickam R.K. (2017). Relationship among circulating anti-Müllerian hormone, insulin like growth factor 1, cadmium and superovulatory response in dairy cows, *Theriogenology*, 2017.

Akbarinejad, V.; Gharagozlou, F.; Vojgani, M.; Bagheri Amirabadi, M. M. (2018). Nulliparous and primiparous cows produce less fertile female offspring with lesser concentration of anti-Müllerian hormone (AMH) as compared with multiparous cows. *Animal Reproduction Science*.

Anckaert, E.; Smitz, J.; Schiettecatte, J.; Klein, B.; Arce, J.C. (2012). The value of antimüllerian hormone measurement in the long GnRH agonist protocol: association with ovarian response, dose adjustments, embryo quality and pregnancy. *Hum Reprod* 2012;27:1829–39.

Arce, J.C.; La Marca, A.; Klein, B.M.; Andersen, A.N.; Fleming, R. (2013). Antimüllerian hormone in GnRH antagonist cycles: prediction of ovarian response and cumulative treatment outcome in good prognosis patients. *Fertil Steril* 2013;99: 1644–53.

Balasz, J.; Gratacós, E. (2011). Delayed Childbearing: Effects on Fertility and the Outcome of Pregnancy. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 29(4), 263–273.

Banco, B.; Grilli, G.; Giudice, C.; Marques, A. T.; Cotti Cometti, S.; Visigalli, G.; Grieco, V. (2016). Immunophenotyping of Rabbit Testicular Germ and Sertoli Cells Across Maturational Stages. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 64(11), 715–726.

Baruselli, P.S.; Batista, E.O.S.; Vieira, L.M.; Souza, A.H. (2015). Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. *Animal Reproduction*, 12 (2015), pp. 487-497

Bo, G.A.; Mapletoft, R.J. (2014) Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* 81, 38-48.

Brackett, B. G.; Mills, J. A.; Jeitles, G. G. (1972). In Vitro Fertilization of Rabbit Ova Recovered from Ovarian Follicles. *Fertility and Sterility*, 23(12), 898–909.

Brassard, M.; AinMelk, Y.; Baillargeon, J.P. (2008). Basic Infertility Including Polycystic Ovary Syndrome. *Medical Clinics of North America*, 92(5), 1163–1192.tal

Broekmans, F.J. (2019). Individualization of FSH Doses in Assisted Reproduction: Facts and Fiction. *Front. Endocrinol.* 10:181.

Broer, S.L.; Dólleman, M.; Opmeer, B.C.; Fauser, B.C.; Mol, B.W.; Broekmans, F.J. (2011). AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2011;17:46–54.

Broer, S.L.; Mol, B.W.; Hendriks, D.; Broekmans, F.J. (2009) The role of antimüllerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril* 2009;91:705–14.

Carver, J. (2003). An in-vitro model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst. *Human Reproduction*, 18(2), 283–290.

Cate R.L.; Mattaliano, R.J.; Hession, C.; Tizard, R.; Farber, N.M.; Cheung, A.; Ninfa, E.G.; Frey, A.Z.; Gash, D.J.; Chow, E.P.; Fisher, R.A.; Bertoni, J.M.; Torres, G.; Wallner, B.P.; Ramachandran, K.L.; Ragin, R.C.; Manganaro, T.F.; MacLaughlin, D.T.; Donahoe, P.K. (1986). Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*, 45, 685–698.

Cortell, C.; Salvetti, P.; Joly, T.; Viudes-de-Castro, M.P. (2015). Effect of different superovulation stimulation protocols on adenosine triphosphate concentration in rabbit oocytes. *Zygote*, 23 (4), pp. 507-513

Deti, L.; Uhlmann, R. A.; Lu, M.; Diamond, M. P.; Saed, G. M.; Fletcher, N. M.; Zhang, J.; Williams, L. J. (2013). *Serum markers of ovarian reserve and ovarian histology in adult mice treated with cyclophosphamide in pre-pubertal age. Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(11), 1421–1429.

Dewailly, D.; Robin, G.; Peigne, M.; Decanter, C.; Pigny, P.; Catteau-Jonard, S. (2016). Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. *Human Reproduction Update*, 22(6), 709–724.

Díaz-Hernández, V.; Caldelas, I.; Montañó, L.M.; Merchant-Larios, H. (2018). Morphological rearrangement of the cortical region, in aging ovaries. *Histol Histopathol*. 2019 Jul;34(7):775-789.

Durlinger, A.L.; Gruijters, M.J.; Kramer, P.; Karels, B.; Ingraham, H.A.; Nachtigal, M.W.; Uilenbroek, J.T.; Grootegoed, J.A.; Themmen, A.P. (2002) Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, 143, 1076–1084.

Durlinger, A.L.; Gruijters, M.J.; Kramer, P.; Karels, B.; Kumar, T.R.; Matzuk, M.M.; Rose, U.M.; de Jong, F.H.; Uilenbroek, J.T.; Grootegoed, J.A.; Themmen, A.P. (2001) Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, 142, 4891–4899.

Eckert, 1998. *Animal Physiology*. McGraw-Hill Interamericana (Ed)

Enkhuizen, P.J.M; Van, M. (1980). Distribution in size and number of ovarian follicles in the pregnant rabbit before and after revulation with hCG. Twelfth annual Conference of Australian Society for Reproductive Biology; 1980; University of New England, 1980.

ENSEMBL, *Rabbit assembly and gene annotation*, visto el 27 de junio de 2019. https://www.ensembl.org/Oryctolagus_cuniculus/Info/Annotation

Ferreira, A. C. A.; Maside, C.; Sá, N. A. R.; Guerreiro, D. D.; Correia, H. H. V.; Leiva-Revilla, J.; Lobo, C.H.; Araújo, V.R.; Apgar, G.A.; Brandão, F.Z.; Figueiredo, J.R.; Campello, C. C. (2016). Balance of insulin and FSH concentrations improves the in vitro development of isolated goat preantral follicles in medium containing GH. *Animal Reproduction Science*, 165, 1–10.

Fischer, B.; Chavatte-Palmer, P.; Viebahn, C.; Navarrete Santos, A.; Duranthon, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction (Cambridge, England)*, 144(1):1–10. Epub 2012/05/15. 10.1530/rep-12-0091 .

Frank, S (2000). Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*;333:853–61

García, N.; Moreno, I.; Alvarez, J.; de la Cruz, M. L.; Navarro, A.; Pérez-Sancho, M.; García Seco, T.; Rodríguez-Bertos, A.; Conty, M.L.; Toraño, A.; Prieto, A.; Domínguez, L.; Domínguez, M. (2014). Evidence of *Leishmania infantum* infection in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in a natural area in Madrid, Spain. *BioMed research international*, 2014, 318254.

Gigli, I.; Cushman R.A.; Wahl, C.M.; Fortune, J.E. (2005) Evidence for a role for anti-Müllerian hormone in the suppression of follicle activation in mouse ovaries and bovine ovarian cortex grafted beneath the chick chorioallantoic membrane. *Molecular Reproduction and Development*, 71, 480–488.

Gilchrist, R. B.; Luciano, A. M.; Richani, D.; Zeng, H. T.; Wang, X.; Vos, M. D.; Sugimura, S.; Richard, F.J.; Thompson, J. G. (2016). Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction*, 152(5), R143–R157.

Guidobaldi, H. A.; Teves, M. E.; Uñates, D. R.; Anastasía, A.; Giojalas, L. C. (2008). Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PloS one*, 3(8), e3040.

Hadley M.E., 1997. *Endocrinology*. Prentice Hall International (Ed). UK.

Hoffman, L. H.; Olson, G. E.; Carson, D. D.; Chilton, B. S. (1998). Progesterone and Implanting Blastocysts Regulate Muc1 Expression in Rabbit Uterine Epithelium1. *Endocrinology*, 139(1), 266–271.

Hohn, H.P.; Mootz, U.; Denker, H.-W. (1992). Development of rabbit preimplantation blastocysts cultured with precultured endometrial tissue. *Reproduction*, 95(2), 409–420.

Huffman, S. R.; Pak, Y.; Rivera, R. M. (2015). Superovulation induces alterations in the epigenome of zygotes, and results in differences in gene expression at the blastocyst stage in mice. *Molecular Reproduction and Development*, 82(3), 207–217.

Kalthur, G.; Salian, S. R.; Nair, R.; Mathew, J.; Adiga, S. K.; Kalthur, S. G.; Zeegers, D.; Hande, M. P. (2016). Distribution pattern of cytoplasmic organelles, spindle integrity, oxidative stress, octamer-binding transcription factor 4 (Oct4) expression and developmental potential of oocytes following multiple superovulation. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(12), 2027.

Kawano, Y.; Honda, A. (2017). Gene Targeting in Rabbits: Single-Step Generation of Knock-out Rabbits by Microinjection of CRISPR/Cas9 Plasmids. *Genome Editing in Animals*, 109–120. DOI:10.1007/978-1-4939-7128-2_10

Kevenaar, M. E.; Meerasahib, M. F.; Kramer, P.; van de Lang-Born, B. M. N.; de Jong, F. H.; Groome, N. P.; Themmen, A.P.; Visser, J. A. (2006). Serum Anti-Müllerian Hormone Levels Reflect the Size of the Primordial Follicle Pool in Mice. *Endocrinology*, 147(7), 3228–3234.

Khan-Dawood, F. S.; Dawood, M. Y. (1984). Chorionic gonadotropin receptors and immunoreactive chorionic gonadotropin in implantation of the rabbit blastocyst. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 148(4), 359–365.

Khoueiry, R.; Ibalá-Rhomdane, S.; Mery, L.; Blachere, T.; Guerin, J. F.; Lornage, J.; Lefevre, A. (2008). Dynamic CpG methylation of the *KCNQ1OT1* gene during maturation of human oocytes. *Journal of Medical Genetics*, 45(9), 583–588.

Kocourkova, J.; Burcin, B.; Kucera, T. (2014). Demographic relevancy of increased use of assisted reproduction in European countries. *Reproductive health*, 11, 37.

Krisher, R. L. (2013). In Vivo and In Vitro Environmental Effects on Mammalian Oocyte Quality. *Annual Review of Animal Biosciences*, 1(1), 393–417.

La Marca, A.; Volpe, A. (2006) Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clinical Endocrinology (Oxford)* 2006;64:603–10.

La Marca, A.; Argento, C.; Sighinolfi, G.; Grisendi, V.; Carbone, M.; D'Ippolito, G.; Artenisio, A.C.; Stabile, G.; Volpe, A. (2012). Possibilities and limits of ovarian reserve testing in ART. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 398–408.

Lan, V.T.; Lihn, N.K.; Tuong, H.M.; Wong, P. C.; Howles, C.M. (2013). Anti-Müllerian hormone versus antral follicle count for defining the starting dose of FSH. *Reprod Biomed Online*. 2013 Oct; 27(4): 390–399.

Laven, J.S.; Mulders, A.G.; Visser, J.A.; Themmen, A.P.; De Jong, F.H.; Fauser, B.C. (2004). Anti-Müllerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89:318–323.

Lawrenz, B.; Melado, L.; Fatemi, H. (2018). Premature progesterone rise in ART-cycles, *Reproductive Biology*, Volume 18, Issue 1, Pages 1-4, ISSN 1642-431X.

Lee, M.; Ahn, J. I.; Lee, A. R.; Ko, D. W.; Yang, W. S.; Lee, G.; Ahn, J.Y.; Lim, J. M. (2017). Adverse Effect of Superovulation Treatment on Maturation, Function and Ultrastructural Integrity of Murine Oocytes. *Molecules and cells*, 40(8), 558–566.

Lefèvre, B.; Caillol, M. (1978) Relationship of estrous behaviour with follicular growth and sex steroid concentration in the follicular fluid in the domestic rabbit. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*, 1978, 18 (6), pp.1435-1441. fhal-00897423f

Li, Q.; Hou, J.; Chen, Y.; An, X. (2009). Full-Term Development of Rabbit Embryos Produced by ICSI with Sperm Frozen in Liquid Nitrogen without Cryoprotectants. *Reproduction in Domestic Animals*.

Marco-Jiménez, F.; Jiménez-Trigos, E.; Almela-Mirallas, V.; Vicente, J. S. (2016). Development of Cheaper Embryo Vitrification Device Using the Minimum Volume Method. *PloS one*, 11(2), e0148661.

Marshall, K.L.; Rivera, R.M. (2018). The effects of superovulation and reproductive aging on the epigenome of the oocyte and embryo. *Mol Reprod Dev.* 2018; 85:90–105. 10.1002/mrd.22951

Marshall, V.A.; Carney, E.W. (2012). Rabbit Whole Embryo Culture. In: Harris C., Hansen J. (eds) *Developmental Toxicology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 889. Humana Press, Totowa, NJ

Monniaux, D.; Baril, G.; Laine, A.L.; Jarrier, P.; Poulin, N.; Cognie, J.; Fabre, S. (2011). Anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. *Reproduction*, 142(6), 845–854.

Mossa, F.; Ireland, J.J. (2019). Anti-Müllerian Hormone (AMH): a biomarker for the ovarian reserve, ovarian function and fertility in dairy cows. *Journal of Animal Science*.

- Nagano, M.; Katagiri, S.; Takahashi, Y. (2006). ATP content and maturational/developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies. *Zygote* 14, 299–304 .
- Nakagawa, Y.; Sakuma, T.; Sakamoto, T.; Ohmuraya, M.; Nakagata, N.; Yamamoto, T. (2015). Production of knockout mice by DNA microinjection of various CRISPR/Cas9 vectors into freeze-thawed fertilized oocytes. *BMC biotechnology*, 15, 33.
- Nandi, A.; Chen, Z.; Patel, R.; Poretsky, L. (2014). Polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2014 Mar;43(1):123-47.
- Orstead, K.M.; Hess, D. L.; Spies, H. G. (1988). Pulsatile Patterns of Gonadotropins and Ovarian Steroids during Estrus and Pseudopregnancy in the Rabbit. *Biology of Reproduction*, 38(4), 733–743.
- Park, K. E.; Ku, S. Y.; Jung, K. C.; Liu, H. C.; Kim, Y. Y.; Kim, Y. J.; Kim, S.H.; Choi, Y.M.; Kim, J.G.; Moon, S. Y. (2013). Effects of urinary and recombinant gonadotropins on in vitro maturation outcomes of mouse preantral follicles. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 20(8), 909–916.
- Pellatt, L.; Rice, S.; Dilaver, N.; Heshri, A.; Galea, R.; Brincat, M.; Brown, K.; Simpson, E.R.; Mason, H.D. (2011). Anti-müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril*, 96 (2011), pp. 1246-1251.e1
- Pigny P., Merlen E., Robert Y., Cortet-Rudelli C., Decanter C., Jonard S., Dewailly D. (2003). Elevated serum level of anti-Müllerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88:5957–5962.
- Pouwer A. W., Farquhar C., Kremer J. A. (2015). Long-acting FSH versus daily FSH for women undergoing assisted reproduction. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Pursel, V.; Johnson, L. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*, 1: 63-68.
- Rajpert-De Meyts, E.; Jorgensen, N.; Graem, N.; Müller, J.; Cate, R.L.; Skakkebaek, N.E. (1999). Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84, 3836–3844.
- Reichardt, H. M.; Fischer, H. J. (2014). Generation of Transgenic Rats Using Lentiviral Vectors. *Multiple Sclerosis. Methods Mol Biol.* 2016;1304:25-37.
- Sato, A.; Otsu, E.; Negishi, H.; Utsunomiya, T.; Arima, T. (2007). Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 22(1), 26–35.
- Sills, E.S.; Alper, M.M.; Walsh, A.P. (2009). Ovarian reserve screening in infertility: practical applications and theoretical directions for research. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 146, 30–36.
- Souza, A. H.; Carvalho, P. D.; Rozner, A. E.; Vieira, L. M.; Hackbart, K. S.; Bender, R. W.; Dresch, A.R.; Verstegen, J.P.; Shaver, R.D.; Wiltbank, M. C. (2015). Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *Journal of dairy science*, 98(1), 169–178.

- Su, H.I.; Sammel, M.D.; Freeman, E.W.; Lin, H.; De Blasis, T.; Gracia, C.R. (2008). Body size affects measures of ovarian reserve in late reproductive age women. *Menopause* 2008;15:857–61.
- Summa, N. M.; Eshar, D.; Snyman, H. N.; Lillie, B. N. (2014). Metastatic anaplastic adenocarcinoma suspected to be of mammary origin in an intact male rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*, 55(5), 475–479.
- Tal, R.; Seifer, D. B. (2017). Ovarian reserve testing: a user's guide. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 217(2), 129–140.
- Tao, T.; Niemann, H. (2000). Cellular characterization of blastocysts derived from rabbit 4-, 8- and 16-cell embryos and isolated blastomeres cultured in vitro. *Human Reproduction*, 15(4), 881–889.
- Thibault, C.; Gerard, M.; Menezo, Y. (1975). Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation. *J Reprod Fertil.* 1975 Dec;45(3):605-10.
- Uysal, F.; Ozturk, S.; Akkoyunlu, G. (2018). Superovulation alters DNA methyltransferase protein expression in mouse oocytes and early embryos. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(3), 503–513.
- Viudes-de-Castro, M. P.; Marco-Jiménez, F.; Más Pellicer, A.; García-Domínguez, X.; Talaván, A. M.; Vicente, J. S. (2019). A single injection of corifollitropin alfa supplemented with hcg increase follicular recruitment and transferable embryos in the rabbit. *Reproduction in Domestic Animals*.
- Viudes-de-Castro, M. P.; Cortell, C.; Mocé, E.; Marco-Jiménez, F.; Joly, T.; Vicente, J. S. (2009). Effect of recombinant gonadotropins on embryo quality in superovulated rabbit does and immune response after repeated treatments. *Theriogenology*, 72(5), 655–662.
- Viudes-de-Castro, M. P.; Marco-Jiménez, F.; Cedano-Castro, J. I.; Vicente, J. S. (2017). Effect of corifollitropin alfa supplemented with or without LH on ovarian stimulation and embryo viability in rabbit. *Theriogenology*, 98, 68–74.
- Weinerman, R.; Ord, T.; Bartolomei, M. S.; Coutifaris, C.; Mainigi, M. (2017). The superovulated environment, independent of embryo vitrification, results in low birthweight in a mouse model. *Biology of reproduction*, 97(1), 133–142.
- Younis, J.S. (2011). Ovarian aging: latest thoughts on assessment and management. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 23, 427–434.