

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 069**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2009 E 09804022 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 2368121**

54 Título: **Procedimiento para seleccionar animales con una elevada capacidad de producción de embriones**

30 Prioridad:

19.12.2008 EP 08291217

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.02.2014

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA) (100.0%)
147 Rue de l'Université
75338 Paris Cedex 07, FR**

72 Inventor/es:

**MONNIAUX-JAUDET, DANIELLE;
FABRE, STÉPHANE y
DALBIES-TRAN, ROZENN**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 443 069 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para seleccionar animales con una elevada capacidad de producción de embriones.

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para seleccionar un animal hembra no humano con capacidad de producir un número apropiado de embriones u ovocitos fecundables.

10 En el ganado bovino, los programas de ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET) se han convertido en un gran negocio internacional. La transferencia de embriones se ha convertido en una herramienta útil para acelerar el progreso genético y la difusión nacional e internacional del mismo. La tecnología está bien establecida y participa en las estrategias de selección genética y cruces para mejorar las características zootécnicas de las razas lecheras y de carne al permitir amplificar el linaje de las hembras seleccionadas. Anualmente se producen en todo el mundo más de 500.000 embriones en vacas superovuladas (estimuladas con FSH). En la actualidad, más del 90% de los futuros reproductores bovinos sometidos a ensayo se producen mediante la tecnología MOET. Sin embargo, el número de embriones transferibles (aproximadamente 6 por vaca donante superovulada) no ha variado significativamente en los últimos veinte años y la utilización de la tecnología MOET en las industrias de los animales se acerca a un punto muerto. De hecho, aproximadamente el 20% de las vacas no produce ningún embrión tras los tratamientos de superovulación, y la tasa de producción de embriones varía mucho entre individuos y es difícil de predecir. La ausencia de previsión sobre la capacidad de un animal hembra para producir embriones comporta costes adicionales en la gestión de los procesos de selección (movilización innecesaria de técnicos para animales que producen un número reducido de embriones transferibles) y reduce la posible aplicación de técnicas relacionadas a la transferencia de embriones, tales como el sexado de embriones.

25 Actualmente, el recuento de folículos antrales por ecografía ovárica es el único método disponible para preseleccionar "buenos donantes de embriones" en un rebaño de ganado (Durocher *et al.*, 2006, *Theriogenology* 65: 102-115; Kawamata, 1994, *J Vet Med Sci.* 56: 965- 967). Este método consiste en una ecografía transrectal. Requiere la presencia simultánea de 2 experimentadores competentes para la adquisición de imágenes ováricas y equipos especiales para la obtención y el tratamiento de imágenes de vídeo. Además, el número de folículos antrales en los ovarios está sometido a variaciones cíclicas a lo largo del tiempo (se pueden observar de 2 a 4 ondas foliculares durante un ciclo sexual de 21 días en la vaca), lo que dificulta la interpretación de los resultados obtenidos. Por consiguiente, hace tiempo que los expertos en la materia buscan un método sencillo y eficaz para seleccionar los animales hembra que puedan producir un número apropiado de embriones u ovocitos fecundables.

35 Recientemente, se ha centrado la atención en la hormona anti-Mülleriana (AMH) en el contexto del tratamiento de la infertilidad anovulatoria en la mujer. Numerosos estudios clínicos han puesto de manifiesto que la AMH es el mejor marcador endocrino de la reserva folicular ovárica en el ser humano. Las concentraciones de AMH medidas en el líquido folicular son un indicador para el potencial de implantación de embriones en los seres humanos (Fanchin *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab.*, mayo de 2007; 92(5): 1796-1802). El documento WO 03/016514 da a conocer un método para predecir y controlar la respuesta de una mujer a un tratamiento contra la esterilidad en base a la medición de su nivel de AMH.

45 La AMH es una glucoproteína de 140 kDa perteneciente al factor de crecimiento transformante de tipo β (TGF β), que se expresa únicamente en las gónadas. Originalmente se identificó por su papel en la diferenciación sexual fetal masculina durante el desarrollo embrionario, pero estudios posteriores han puesto de manifiesto que tiene un efecto inhibitorio sobre el desarrollo y el funcionamiento de los órganos reproductores de ambos sexos. En el ovario, la expresión de AMH se limita a un solo tipo de células, las células de la granulosa (Vigier *et al.*, 1984, *Endocrinology* 114: 1315-1320; Takahashi *et al.*, 1986, *Biol Reprod* 35: 447-453). La expresión de AMH alcanza su máximo en las células de la granulosa de folículos preantrales y antrales pequeños, disminuye durante el crecimiento folicular terminal y se han encontrado concentraciones bajas de AMH en el líquido folicular de grandes folículos antrales y preovulatorios (Monniaux *et al.*, 2008, *Biol Reprod* 79: 387-396). Este patrón de expresión en las células de la granulosa de folículos en crecimiento hace de la AMH un marcador ideal para el tamaño del *pool* de folículos ováricos. Los inventores han observado anteriormente que en la vaca, como en el ser humano, la concentración plasmática de AMH es un buen marcador del estado de la población folicular capaz de responder al tratamiento con FSH (hormona estimulante del folículo) y ovular (Rico *et al.*, 2009, *Biol Reprod* 80: 50-59).

55 La ovulación es un primer paso necesario pero no suficiente para obtener ovocitos fecundables y embriones transferibles. Los demás pasos, que comprenden la supervivencia del ovocito ovulado en el oviducto, el tránsito y la supervivencia del esperma en el tracto genital femenino tras la inseminación, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano hasta la mórula o el estadio de blastocito, también son decisivos para la producción de ovocitos y embriones de buena calidad. Los resultados previos han demostrado que la superovulación puede disminuir la competencia de desarrollo de los ovocitos bovinos (Lonergan *et al.*, 1994, *Mol Reprod Dev* 37: 48-53; Blondin *et al.*, 1996, *Theriogenology* 46: 1191-1203) y que una alta capacidad de ovulación puede producir a veces una baja proporción de embriones transferibles (Ireland *et al.*, 2007, *Human Reprod* 22: 1687-1695). Estos resultados pueden explicarse por una mala sincronización entre la ovulación y el momento de la inseminación, o por perfiles endocrinos anormales de esteroides que pueden afectar al transporte del esperma y al desarrollo y la supervivencia embrionarios en caso de múltiples ovulaciones (Greve y Callesen, *Reprod Nutr Dev* 41: 451-459).

Debido a la multiplicidad de las hormonas, los factores de crecimiento y las interacciones célula-célula que influyen en el número y la calidad de los ovocitos y embriones, hasta ahora no existe ningún método fiable capaz de predecir el número de ovocitos fecundables y embriones transferibles que pueden ser producidos por una vaca donante potencial tras un tratamiento de superovulación.

5 Ahora, los inventores han descubierto que la concentración plasmática de AMH podría ser no sólo un marcador endocrino de la población folicular, sino también un marcador predictivo fiable del número de embriones transferibles u ovocitos fecundables que puede producir un animal tras un tratamiento de superovulación. La presente invención da a conocer, por primera vez, un método de pronóstico para determinar la capacidad de producción de embriones u ovocitos por parte de animales potencialmente donantes de embriones u ovocitos a partir del resultado de la medición de la concentración de AMH en una muestra biológica de dichos donantes potenciales. Los inventores han demostrado que la concentración plasmática o sérica de AMH puede permanecer estable en animales individuales durante varios meses, y esta propiedad hace que este pronóstico se lleve a cabo únicamente mediante un análisis de sangre para cada animal.

15 En el primer aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para predecir el número de embriones transferibles u ovocitos fecundables que puede producir un animal hembra no humano individual tras el tratamiento de superovulación, comprendiendo dicho procedimiento la determinación de la concentración de hormona anti-Mülleriana en una muestra de sangre antes de llevar a cabo un tratamiento ovárico de superovulación.

20 En el contexto de la presente invención, "número adecuado de embriones transferibles u ovocitos fecundables" debe entenderse como por lo menos 10 embriones transferibles, o por lo menos 10 ovocitos fecundables.

25 Los embriones transferibles son los que se califican como embriones "buenos" de acuerdo con la norma morfológica clásica de forma y color que se utiliza en la práctica habitual (Callesen *et al.*, 1995, J Anim Sci. 73: 1539-1543) y las definiciones elaboradas por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. Según la presente invención, la producción de embriones u ovocitos se alcanza según técnicas bien conocidas en la técnica anterior. Un animal donante de embriones que puede producir más de 10 embriones transferibles tras un tratamiento de superovulación se define como un buen donante de embriones. Un donante de embriones que produce menos de 5 embriones transferibles se define como un mal donante de embriones.

30 Los ovocitos fecundables son los ovocitos recogidos de los folículos de un animal hembra y que tienen capacidad para ser fecundados *in vitro* y dar lugar a embriones transferibles.

35 Los embriones se pueden producir por fecundación *in vivo* a través de una inseminación natural o artificial de un animal hembra sometido previamente a un tratamiento ovárico de superovulación. Los embriones producidos de este modo se recogen a través del aparato genital. Los embriones también se pueden producir por fecundación *in vitro* de ovocitos recogidos por punción folicular (técnica "ovum pick-up" u OPU) de los ovarios de un animal hembra previamente sometido a tratamiento ovárico de superovulación. Los ovocitos (óvulos inmaduros) se recogen de los folículos de los ovarios por aspiración mediante orientación por ultrasonidos a través de las paredes de la vagina. Los ovocitos se maduran en el laboratorio durante 24 horas y a continuación se fecundan, y los embriones se cultivan durante un periodo adicional de siete días antes de transferirse a los destinatarios preparados o de congelarse para su utilización posterior.

45 En una forma de realización particular, el procedimiento según la presente invención comprende las siguientes etapas:

- a) medir la concentración de la hormona anti-Mülleriana en una muestra de sangre,
- 50 b) comparar dicha concentración con dos valores de referencia, respectivamente correspondientes a "alto" y "bajo",

55 y en el que, si la concentración de la hormona anti-Mülleriana es mayor que el valor de referencia "alto", se considera que el animal tiene una buena capacidad de producir embriones transferibles u ovocitos fecundables; en cambio, si la concentración de la hormona anti-Mülleriana es inferior al valor de referencia "bajo", se considera que el animal tiene una baja capacidad de producir embriones transferibles u ovocitos fecundables.

Dicha muestra biológica puede ser cualquier líquido biológico seleccionado entre el grupo que comprende plasma, suero, leche, orina o saliva.

60 En una forma de realización preferente según la presente invención, dicha muestra biológica es plasma o suero.

Según la presente invención, las concentraciones de AMH se pueden medir por cualquiera de los métodos clásicos de dosificación que se describen en la bibliografía o conocidos por el experto en la materia.

65 En otra forma de realización preferente de la presente invención, el animal es un rumiante.

En una forma de realización más preferente del presente procedimiento según la presente invención, el rumiante se selecciona de entre el grupo que comprende las especies bovina y caprina.

5 En la presente invención, el término “valor de referencia” se utiliza para definir una concentración umbral de AMH por encima (para la referencia “alto”) o por debajo (para la referencia “bajo”) de la cual se predice que se recuperará respectivamente un número apropiado o inapropiado de embriones transferibles u ovocitos fecundables de un animal donante con un nivel de confianza estadísticamente superior al 95%. Estos valores de referencia han sido
10 determinados a través del análisis estadístico de una serie de mediciones de la concentración de AMH y el número de embriones producidos en diferentes sujetos.

Según la presente invención, el valor de referencia “alto” para la concentración plasmática de la hormona anti-Mülleriana en la especie bovina está comprendido entre 160 pg/ml y 200 pg/ml, siendo preferentemente de 180
15 pg/ml para la producción de más de 10 embriones transferibles u ovocitos fecundables por tratamiento ovárico de superovulación, y el valor de referencia “bajo” para la concentración plasmática de la hormona anti-Mülleriana en la especie bovina está comprendido entre 80 pg/ml y 110 pg/ml, siendo preferentemente de 90 pg/ml para la producción de menos de 5 embriones transferibles u ovocitos fecundables por tratamiento ovárico de superovulación.

20 En el segundo aspecto, la presente invención también se refiere a la utilización de la hormona anti-Mülleriana como marcador predictivo del número de embriones transferibles u ovocitos fecundables que se pueden producir en un animal hembra no humano.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos y figuras 1 a 5.

25 La figura 1A ilustra la relación entre el número medio de embriones producidos por hembra y su concentración plasmática de AMH ($r = 0,49$, $p < 0,001$). Se tomó una muestra de sangre de 45 vacas durante su primera lactancia y a continuación dichas vacas se sometieron a un tratamiento ovárico de superovulación, inseminación artificial y recolección de embriones.

30 La figura 1B ilustra la relación entre el número máximo de embriones producidos por hembra y su concentración plasmática de AMH ($r = 0,58$, $p < 0,0001$). Se tomó una muestra de sangre de 45 vacas durante su primera lactancia y a continuación dichas vacas se sometieron a un tratamiento ovárico de superovulación, inseminación artificial y recolección de embriones.

35 La figura 1C ilustra la relación entre la concentración plasmática de AMH y el número medio de embriones producidos por hembra. Las 45 vacas se dividieron en tres grupos según su concentración de AMH, el grupo [0-100] ($n = 16$), el grupo [100-200] ($n = 15$) y el grupo [> 200] ($n = 14$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo [0-100].

40 La figura 1D ilustra la relación entre la concentración plasmática de AMH y el número máximo de embriones producidos por hembra. Las 45 vacas se dividieron en tres grupos según su concentración plasmática de AMH, tal como se ha definido en la leyenda de la figura 1C. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente al grupo [0-100].

45 La figura 2A ilustra la relación entre el número medio de embriones transferibles producidos por hembra y su concentración plasmática de AMH ($r = 0,32$, $p < 0,05$). Se tomó una muestra de sangre de 45 vacas durante su primera lactancia y a continuación dichas vacas se sometieron a un tratamiento ovárico de superovulación, inseminación artificial y recolección de embriones.

50 La figura 2B ilustra la relación entre el número máximo de embriones transferibles producidos por hembra y su concentración plasmática de AMH ($r = 0,38$, $p < 0,01$). Se tomó una muestra de sangre de 45 vacas durante su primera lactancia y a continuación dichas vacas se sometieron a un tratamiento ovárico de superovulación, inseminación artificial y recolección de embriones.

55 La figura 2C ilustra la relación entre la concentración plasmática de AMH y el número medio de embriones transferibles producidos por hembra. Las 45 vacas se dividieron en tres grupos según su concentración plasmática de AMH, tal como se ha definido en la leyenda de la figura 1C. * $p < 0,05$ frente al grupo [0-100].

60 La figura 2D ilustra la relación entre la concentración plasmática de AMH y el número máximo de embriones transferibles producidos por hembra. Las 45 vacas se dividieron en tres grupos según su concentración plasmática de AMH, tal como se ha definido en la leyenda de la figura 1C. * $p < 0,05$, frente al grupo [0-100].

65 La figura 3A ilustra la producción media de embriones (embriones totales y embriones transferibles) por hembra. Las 45 vacas se dividieron en dos grupos según su capacidad (C) de producción de embriones, el grupo [$C < 10$] ($n = 13$) y el grupo [$C > 10$] ($n = 32$). La capacidad se definió como el número máximo de embriones transferibles que se pudieron recoger por hembra tras el tratamiento de superovulación. *** $p < 0,001$ frente al grupo [$C < 10$].

La figura 3B ilustra la concentración plasmática media de AMH. Las 45 vacas se dividieron en dos grupos según su capacidad (C) de producción de embriones, tal como se ha definido en la leyenda de la figura 3A. **p < 0,01 frente al grupo [C<10].

5 La figura 4A ilustra las variaciones individuales de concentración de AMH de 5 vacas con una concentración media de AMH baja (< 150 pg/ml), medida antes de cada repetición del tratamiento ovárico de superovulación y OPU ("ovum pick-up").

10 La figura 4B ilustra las variaciones individuales de concentración de AMH de 5 vacas con una concentración media de AMH alta (> 150 pg/ml), medida antes de cada repetición del tratamiento ovárico de superovulación y OPU.

15 La figura 5A ilustra el efecto de las repeticiones de la OPU sobre las concentraciones de AMH antes del tratamiento (círculos negros, escala de la derecha) y en el número de folículos grandes en la OPU (barras negras, escala de la izquierda). Las vacas se trataron repetidamente (n = 4 a 11 repeticiones por vaca). El eje horizontal representa el número de repeticiones de la OPU. El número de vacas estudiadas se indica entre paréntesis.

20 La figura 5B ilustra el valor del coeficiente de repetibilidad de la concentración de AMH antes del tratamiento (círculos negros) y del número de folículos grandes en la OPU (cuadrados huecos). Las vacas se trataron repetidamente (n = 4 a 11 repeticiones por vaca). El eje horizontal representa el número de OPU llevadas a cabo por vaca. El número de vacas estudiadas se indica entre paréntesis.

25 **Ejemplo 1: concentración plasmática de AMH y producción de embriones tras la superovulación en vacas Prim'Holstein x Normanda**

Materiales y métodos

Animales y diseño experimental

30 Cuarenta y cinco vacas lecheras cruzadas Prim'Holstein x Normanda, de entre 2 y 4 años de edad, se sometieron a un análisis de sangre durante su primera lactancia, entre 60 y 90 días después del parto, para determinar su concentración plasmática de AMH. Se introdujo parte de la sangre (de 2 a 4 ml) en un tubo heparinizado y tras la centrifugación el plasma se recuperó y se almacenó a -20°C hasta llevar a cabo el ensayo de AMH.

35 Posteriormente, estas vacas se sometieron a tratamientos ováricos repetidos de superovulación (de 1 a 9 repeticiones del tratamiento por animal, número medio de repeticiones por animal = 5,4), tras cada uno de los cuales se llevó a cabo una inseminación artificial y una recolección de embriones. Cada tratamiento de superovulación consistió en la administración de 32 mg de FSH (hormona foliculoestimulante, STIMOFUL®), administrada mediante dos inyecciones al día durante 4 días siguiendo un esquema de disminución de dosis estándar (Mapletoft *et al.*, 2002, *Reprod Nutr Dev* 42: 601-611). El intervalo entre la recuperación de la sangre durante la lactancia y la primera recolección de embriones varió dentro de un intervalo de [3-30] meses entre las vacas (intervalo medio = 17,2 meses). Los embriones se recogieron mediante el lavado de los cuernos uterinos, se contaron y se evaluó su calidad según criterios morfológicos clásicos (Callesen *et al.*, 1995, *J Anim Sci* 73: 1539-1543). Los embriones con una calidad de entre 1 y 3 según los criterios de Callesen *et al.* (1995) se definieron como embriones transferibles (es decir, buenos).

Ensayo de AMH

50 Se midió la AMH con el kit Active MIS/AMH ELISA (Beckman Coulter France, Roissy CDG, Francia), tal como se ha descrito anteriormente (Monniaux *et al.*, 2008, *Biol Reprod* 79: 387-396). La AMH se midió en 50 µl de plasma sin diluir. Las concentraciones de AMH fueron más altas que el límite de detección del ensayo (1 pg por pocillo, correspondiente a 0,020 ng/ml en muestras de plasma) en todos los plasmas sometidos a ensayo. El coeficiente de variación intraanalítica fue del 11,8% y del 3,6% para las muestras plasmáticas que contenían una concentración de AMH de 0,033 ng/ml y 0,125 ng/ml, respectivamente.

Resultados

60 Se observó una estrecha correlación positiva entre la concentración plasmática de AMH medida en las vacas durante su primera lactancia y el número medio y máximo de embriones recogidos por animal ($r = 0,49$, $p < 0,001$ y $r = 0,58$, $p < 0,0001$, respectivamente, figuras 1A y 1B). La asignación de los animales a 3 grupos según su concentración de AMH pone de manifiesto que los animales con una concentración de AMH comprendida entre 100 pg/ml y 200 pg/ml y mayor de 200 pg/ml produjeron un mayor número de embriones que los animales con una concentración de AMH menor de 100 pg/ml (grupo [100-200] frente al grupo [0-100], $p < 0,05$; grupo [> 200] frente al grupo [0-100], $p < 0,01$ para el número medio y máximo de embriones, figuras 1C y 1D).

También se observó una correlación entre el número medio y máximo de embriones transferibles recogidos por animal y la concentración plasmática de AMH medida en las vacas durante su primera lactancia ($r = 0,32$, $p < 0,05$ y $r = 0,38$, $p = 0,01$, respectivamente, figuras 2A y 2B). La asignación de los animales a 3 grupos según su concentración de AMH pone de manifiesto que los animales con una concentración de AMH comprendida entre 100 pg/ml y 200 pg/ml y mayor de 200 pg/ml produjeron un mayor número de embriones transferibles que los animales con una concentración de AMH menor de 100 pg/ml (grupo [100-200] frente al grupo [0-100], $p < 0,05$; grupo [> 200] frente al grupo [0-100], $p < 0,05$ para el número medio y el número máximo de embriones transferibles, figuras 2C y 2D).

En otro análisis, los animales se asignaron a 2 grupos según su capacidad de producción de embriones transferibles. Esta capacidad (C) se definió como el número máximo de embriones transferibles que se pudieron recoger por animal tras el tratamiento de superovulación. Los animales con una elevada capacidad de producción de embriones transferibles (buenos donantes de embriones, $C > 10$) tenían una concentración plasmática de AMH más alta medida durante su primera lactancia ($p < 0,01$, figura 3B), y también produjeron un mayor número medio de embriones totales ($p < 0,001$) y de embriones transferibles ($p < 0,001$, figura 3A) que los donantes de embriones con $C < 10$. Además, los buenos donantes de embriones fueron capaces de producir, de promedio, 5 veces más embriones transferibles en comparación con los malos donantes de embriones (donantes con $C < 5$) y tenían una concentración plasmática de AMH 2,7 veces más elevada que los malos donantes de embriones durante su primera lactancia.

En análisis posteriores, se llevó a cabo un modelado de datos utilizando distintos modelos lineales y no lineales, y el mejor ajuste se encontró utilizando modelos de regresión polinómica. Con estos modelos y los datos presentes, la elección de un valor de referencia de concentración de AMH bajo, comprendido entre 80 pg/ml y 110 pg/ml, permitió descartar el 70% de los malos donantes de embriones entre la población de malos donantes de embriones, y la elección de un valor de referencia de concentración de AMH alto, comprendido entre 160 pg/ml y 200 pg/ml, permitió seleccionar el 60% de buenos donantes de embriones entre la población de buenos donantes de embriones.

Ejemplo 2: repetibilidad de la concentración plasmática de AMH y respuesta folicular en vacas Prim'Holstein tras la superovulación y la OPU

Materiales y métodos

Animales y diseño experimental

Se sometieron trece vacas Prim'Holstein a tratamientos ováricos repetidos de superovulación, cada uno de ellos seguido por OPU en los folículos grandes (diámetro > 6 mm), que se detectaron por ecografía ovárica. Cada tratamiento de superovulación consistió en la administración de 32 mg de FSH (STIMOFUL®), administrada mediante dos inyecciones al día durante 4 días siguiendo un esquema de disminución de dosis, y se llevó a cabo una punción folicular 48 h después de la última inyección de FSH. En cada repetición del tratamiento se tomó una muestra de sangre (de 2 a 4 ml) en un tubo heparinizado justo antes de la primera inyección de FSH (antes del tratamiento) y en el día de la OPU (en la OPU), y a continuación el plasma se recuperó tras la centrifugación y se almacenó a -20°C hasta llevar a cabo el ensayo de AMH.

Las vacas iniciaron el protocolo experimental en enero (6 vacas), en marzo (4 vacas) o en mayo (3 vacas). A continuación los animales se trataron y se sometieron a OPU repetidamente (entre 4 y 11 repeticiones por vaca) hasta diciembre. No se llevó a cabo ningún tratamiento ni ninguna OPU en las vacas durante la época de más calor (julio y agosto). Cinco vacas con una respuesta folicular baja (< 15 folículos grandes en cada punción) abandonaron el protocolo sólo 3 meses después de su inicio.

Ensayo de AMH

Se midió la concentración plasmática de AMH con el kit Active MIS/AMH ELISA (Beckman Coulter France, Roissy CDG, Francia), tal como se ha descrito en el ejemplo 1.

Análisis de los datos

Para las comparaciones entre grupos, los datos se analizaron mediante prueba t o ANOVA unidireccional. A fin de evaluar el efecto estacional, se compararon 5 períodos: enero-febrero, marzo-abril, mayo-junio, septiembre-octubre y noviembre-diciembre. Se analizaron los efectos de la repetición de los tratamientos sobre el número de folículos grandes y la concentración de AMH mediante ANOVA con medidas repetidas. La repetibilidad de cada parámetro se calculó como la relación entre la varianza entre animales y la suma de las varianzas entre animales y residual. Para los estudios de correlación, la significación del valor del coeficiente de correlación se consideró según los valores críticos de la r de Bravais-Pearson. En todos los análisis, las diferencias con $p > 0,05$ se consideraron no significativas.

Resultados

5 Se llevaron a cabo un total de 90 tratamientos sobre las 13 vacas, cada uno de ellos seguido por una OPU. La concentración de AMH aumentó después del tratamiento ($176,6 \pm 11,8$ pg/ml frente a $253,7 \pm 19,8$ pg/ml, AMH antes del tratamiento frente a AMH en la OPU, $p < 0,01$) y se observó una correlación altamente significativa entre las concentraciones de AMH medidas antes del tratamiento y en el momento de la OPU ($r = 0,88$, $p < 0,0001$). El número de folículos grandes en la OPU se correlacionó significativamente con la concentración de AMH antes del tratamiento ($r = 0,56$, $p < 0,0001$) y en el momento de la OPU ($0,65$, $p < 0,0001$).

10 No se observó ningún efecto estacional ni en el número de folículos grandes de los ovarios en la OPU ni en la concentración de AMH. Para todos los parámetros se observó una tendencia al aumento con el tiempo, probablemente relacionado con el hecho de que 5 animales con una respuesta baja se dieron de baja tempranamente del protocolo experimental, tal como se ha mencionado anteriormente, pero dicha tendencia no resultó significativa (tabla 1).

15 La concentración de AMH antes del tratamiento mostró variaciones bajas entre animales con el tiempo (figuras 4A y 4B). La figura 5A y la figura 5B ilustran la repetibilidad individual de la concentración de AMH antes del tratamiento y del número de folículos en la OPU durante las sesiones repetidas de OPU. No se observó ningún efecto significativo del número de repeticiones de la OPU sobre el número de folículos grandes presentes en los ovarios en la OPU ni sobre la concentración de AMH antes del tratamiento (figura 5A). Cuando se analizaron los datos para 4 ($n = 13$ vacas), 5 ($n = 10$ vacas), 6 ($n = 9$ vacas), 7 ($n = 6$ vacas), 8 ($n = 5$ vacas) u 11 OPU repetidas ($n = 3$ vacas), se observó una repetibilidad muy significativa en todos los análisis para la concentración de AMH antes del tratamiento ($p < 0,0001$) (figura 5B). Se observaron resultados parecidos para la concentración de AMH en el momento de la OPU (datos no mostrados).

25 Tabla 1: Efecto estacional sobre la concentración de AMH antes del tratamiento de superovulación y en el momento de la OPU, y sobre el número de folículos grandes en la OPU

Período	J-F	M-A	M-J	J-A	S-O	N-D
Número de vacas	6	8	7	0	8	8
AMH antes del tratamiento (pg/ml)	$126,1 \pm 28,5$	$136,6 \pm 42,4$	$182,5 \pm 29,6$	NA	$229,0 \pm 52,3$	$256,4 \pm 44,3$
AMH en la OPU (pg/ml)	$164,3 \pm 34,1$	$176,4 \pm 59,7$	$257,2 \pm 46,8$	NA	$417,5 \pm 101,8$	$340,5 \pm 63,8$
Número de folículos grandes en la OPU	$11,75 \pm 2,26$	$11,65 \pm 2,03$	$14,19 \pm 2,52$	NA	$12,19 \pm 2,76$	$16,00 \pm 3,70$

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para predecir el número de embriones transferibles u ovocitos fecundables que puede producir un animal hembra no humano individual después de un tratamiento de superovulación, comprendiendo dicho procedimiento la determinación de la concentración de la hormona anti-Mülleriana en una muestra de sangre antes de un tratamiento de superovulación en el ovario.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:
- 10 a) medir la concentración de la hormona anti-Mülleriana en una muestra de sangre,
- b) comparar dicha concentración con dos valores de referencia, respectivamente correspondientes a “alto” y “bajo”,
- 15 y en el que, si la concentración de la hormona anti-Mülleriana es mayor que el valor de referencia “alto”, entonces se considera que el animal tiene una buena capacidad de producir embriones transferibles u ovocitos fecundables; en cambio, si la concentración de la hormona anti-Mülleriana es inferior al valor de referencia “bajo”, se considera que el animal tiene una baja capacidad de producir embriones transferibles u ovocitos fecundables.
- 20 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de la hormona anti-Mülleriana que se mide es la concentración plasmática o sérica de la hormona anti-Mülleriana.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el animal es un rumiante.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el rumiante se selecciona de entre el grupo que comprende las especies bovina y caprina.
- 30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el valor de referencia “alto” de la concentración plasmática de la hormona anti-Mülleriana en la especie bovina está comprendido entre 160 pg/ml y 200 pg/ml, siendo preferentemente de 180 pg/ml para la producción de más de 10 embriones transferibles u ovocitos fecundables por tratamiento ovárico de superovulación, y el valor de referencia “bajo” de la concentración plasmática de la hormona anti-Mülleriana en la especie bovina está comprendido entre 80 pg/ml y 110 pg/ml, siendo preferentemente de 90 pg/ml para la producción de menos de 5 embriones transferibles u ovocitos fecundables por tratamiento ovárico de superovulación.
- 35

FIGURA 1

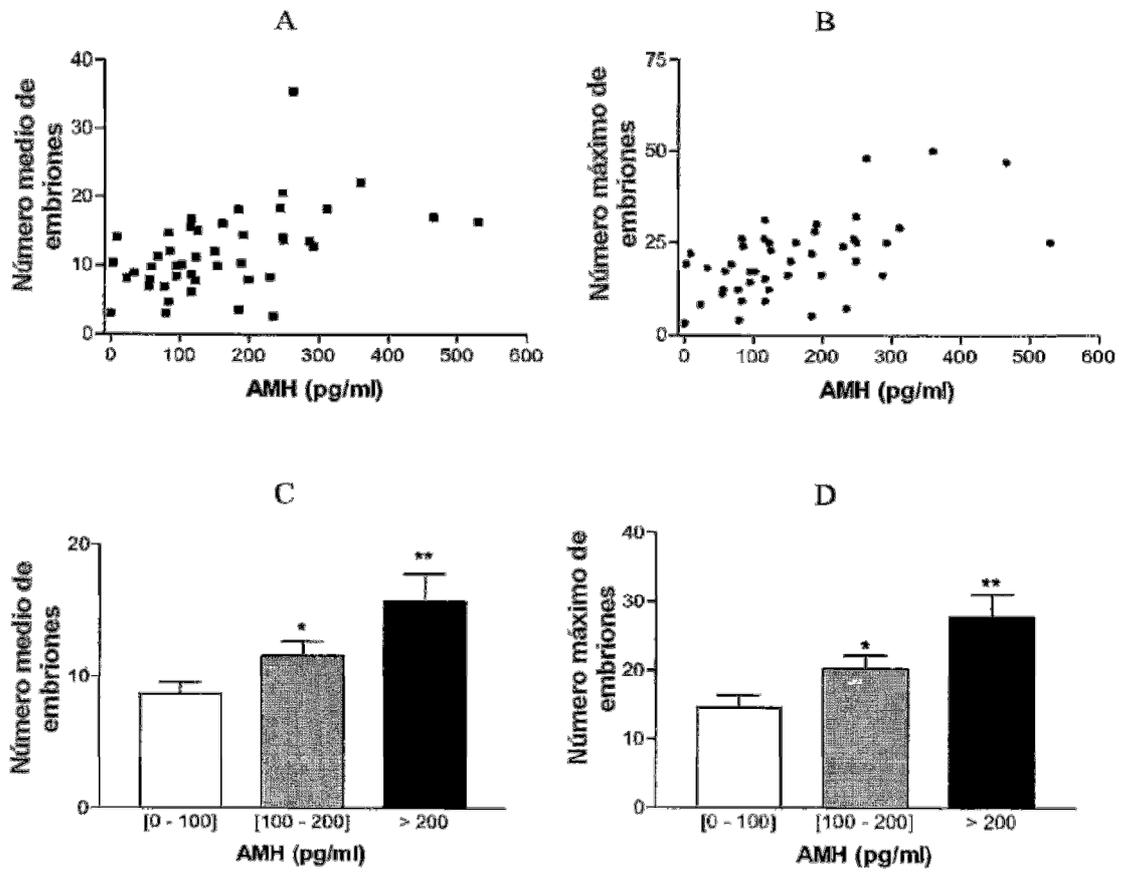


FIGURA 2

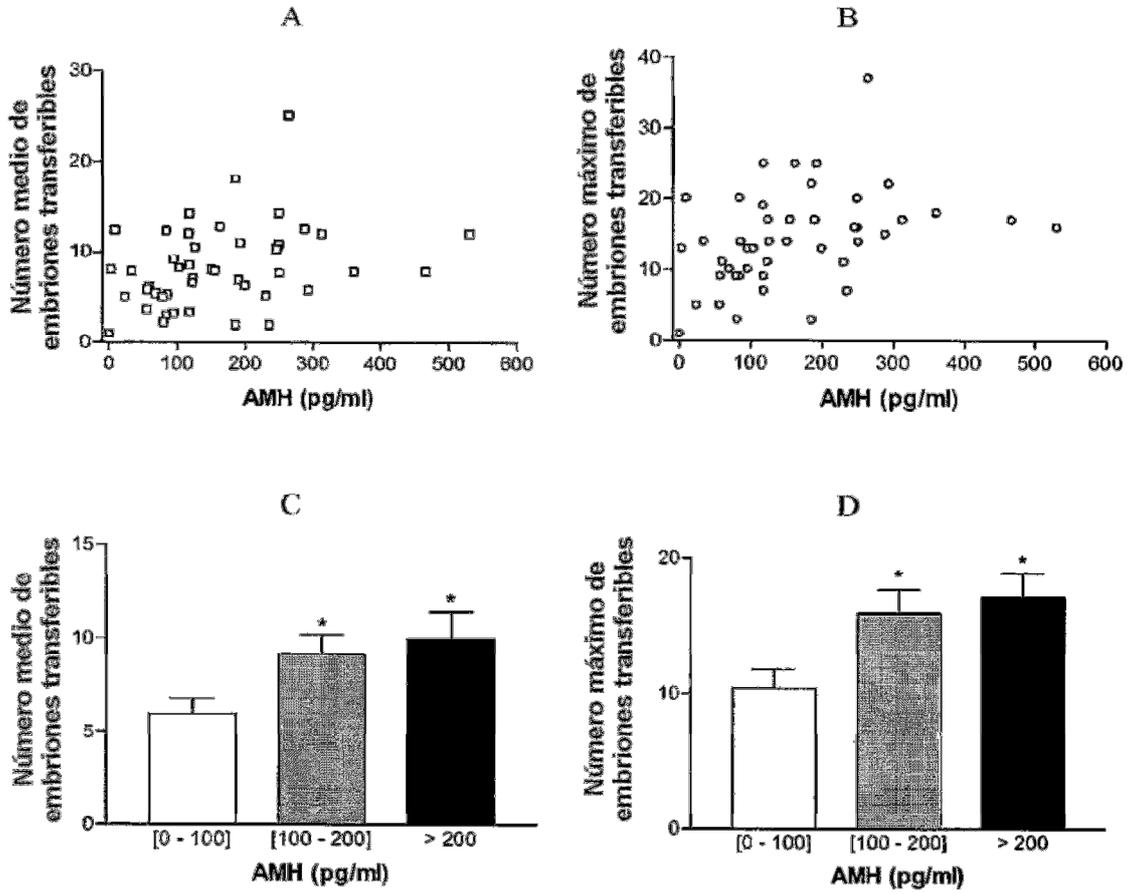


FIGURA 3

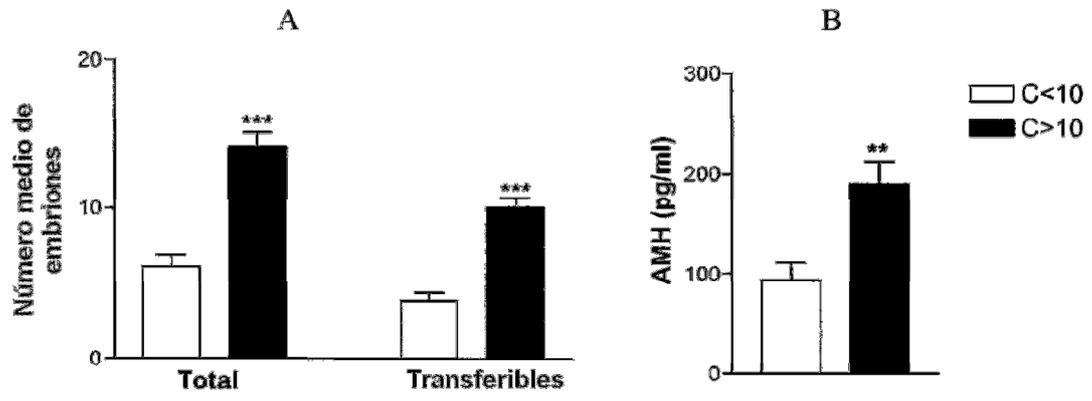


FIGURA 4

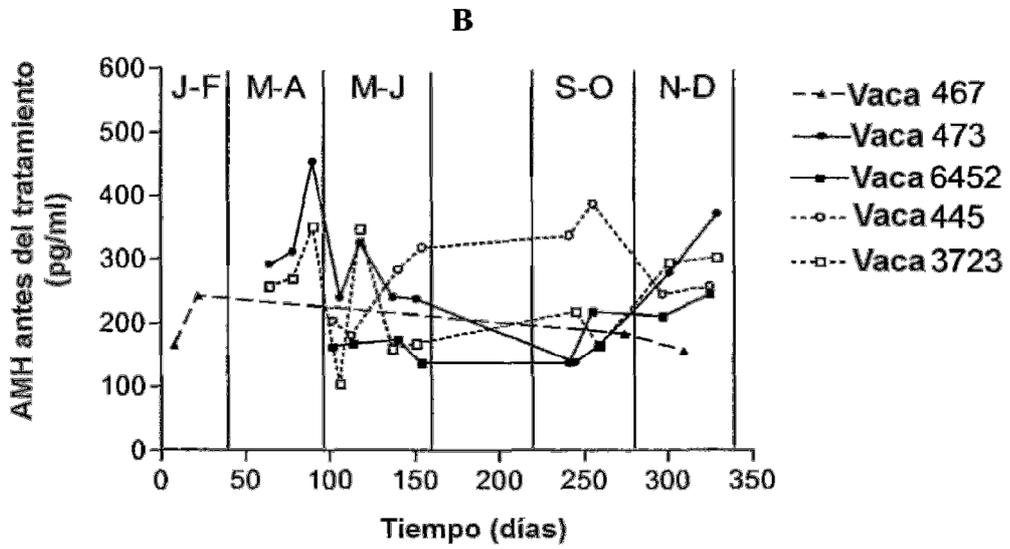
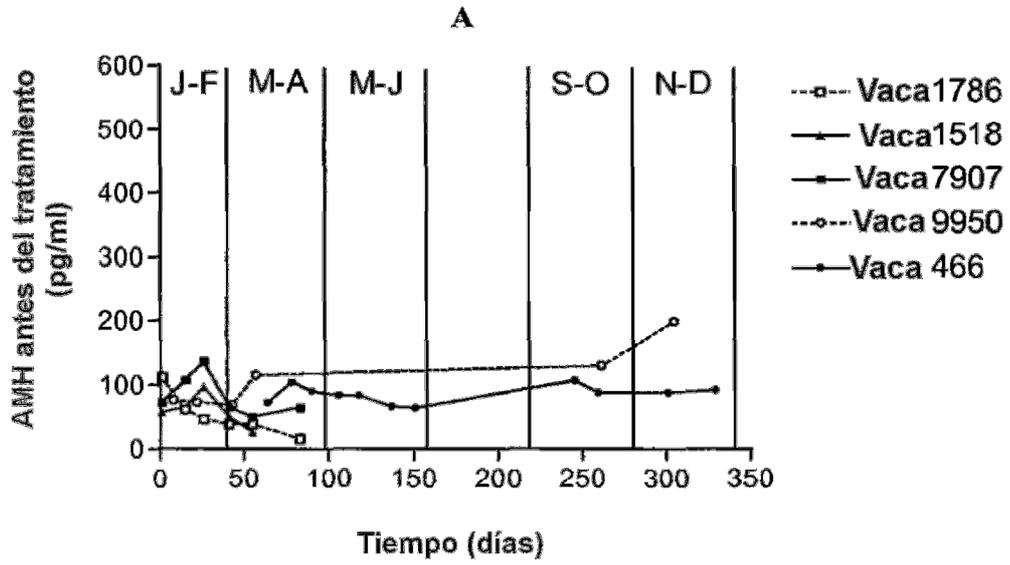


FIGURA 5

