



Concentraciones séricas de **hormona antimulleriana y estradiol** en las primerizas y su edad en la pubertad

Se ha documentado en varias especies que los niveles sanguíneos de la hormona antimulleriana (AMH) son una medida indirecta del número de folículos ováricos, que pueden ser un indicador del potencial de fertilidad de la hembra.

Nutthee Am-in^{1,2}, Junpen Suwimonteerabutr^{1,2} y Roy N. Kirkwood^{3*}

¹Department of Obstetrics, Gynecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand; nutthee.a@chula.ac.th (N.A.-i.); Junpen.S@chula.ac.th (J.S.)

²Swine Reproduction Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³School of Animal and Veterinary Sciences, University of Adelaide, Roseworthy, SA 5371, Australia

*Contacto: roy.kirkwood@adelaide.edu.au

Artículo original: Am-In N, Suwimonteerabutr J, Kirkwood RN. Serum Anti-Mullerian Hormone and Estradiol Concentrations in Gilts and Their Age at Puberty. *Animals (Basel)*. 2020 Nov 23;10(11):2189. doi: 10.3390/ani10112189. PMID: 33238427; PMCID: PMC7700628.

En el presente estudio se determinan los niveles de AMH en cerdas inmaduras de varias edades y se relacionan con medidas potenciales de fertilidad futura, incluida la edad en la pubertad y el número de folículos ováricos en la pubertad, y la respuesta de las cerdas a la estimulación ovárica después de la pubertad.

En el estudio se realizaron dos experimentos:

Experimento uno

Se obtuvieron muestras de sangre de 200 cerdas a los 90, 120, 150, 180 y 200 días de edad. Se analizaron muestras de suero de las 30 cerdas más precoces en mostrar el celo ($166,1 \pm 0,7$ días) y las 30 menos precoces ($198,8 \pm 0,6$ días) que presentaron el celo hasta los 200 días, y otras 18 cerdas que permanecieron en anestro a los 200 días, para determinar las concentraciones séricas de AMH y estradiol (E2). Las primerizas que fueron antes púberes tenían niveles de AMH más altos ($p < 0,05$) que las que tardaron más en ser púberes, y ambos grupos tenían niveles más altos de AMH que las cerdas en anestro ($p < 0,05$). Independientemente de



RauACastellanos/shutterstock.com



Los resultados apoyan la explicación de que los niveles sanguíneos de AMH reflejan la futura fertilidad de las cerdas.



la edad, el E2 sérico fue mayor ($p < 0,05$) en las cerdas que alcanzaron la pubertad que en las que permanecieron en anestro. En la detección espontánea del celo puberal, no hubo efecto de la edad puberal en el número de folículos ováricos preovulatorios.

Experimento dos

152 cerdas prepúberes recibieron una inyección intramuscular (IM) de 400 UI de eCG y 200 UI de hCG (PG600® MSD Animal Health) y luego tuvieron contacto con el verraco para detectar el inicio del estro. Las concentraciones séricas de AMH fueron más altas ($p < 0,05$) en las primeras 25 cerdas en mostrar pubertad que las últimas 28 cerdas, y además las primeras cerdas también tenían más folículos preovulatorios ($p < 0,0001$).

Tomados en conjunto, los datos apuntan a una asociación entre las concentraciones séricas de AMH, el grado de madurez fisiológica y el desarrollo folicular ovárico en las cerdas de cría.

Introducción

Una medida importante del rendimiento de las cerdas y, por lo tanto, de la rentabilidad potencial de la granja es el número de cerdos producidos por cerda durante su vida útil, una métrica que depende del tamaño de la camada y el número de camadas producidas (es decir, paridad a eliminación). Existen varios factores de manejo o ambientales que pueden afectar a la paridad en el momento de la eliminación, pero el principal factor que influye es la calidad de las cerdas seleccionadas para el hato de cerdas^{1,2}. Si bien son conocidos los criterios de selección para la robustez y, por extensión, la longevidad potencial, los indicadores de fertilidad potencial son limitados. Según la revisión realizada por Patterson y Foxcroft², se pueden implementar protocolos de manejo para acelerar el inicio de la pubertad en las primerizas e identificar a las primerizas que están madurando antes y que, por lo tanto, serán potencialmente más fértiles.

Sin embargo, sería más beneficioso para la industria disponer de un indicador de fertilidad potencial futura determinada a una edad más temprana, antes de la selección final de los reemplazos.



AMH como marcador del tamaño de la reserva ovárica

Sin embargo, en cerdos, la expresión de la AMH también se ha detectado en las células de la teca folicular preovulatoria del ovario y en los cuerpos lúteos⁸. También hay evidencia limitada de que la concentración sérica de AMH en cerdas jóvenes al destete se asocia con una mejor respuesta en el estro a la exposición posterior del verraco⁹, aunque no hubo diferencias relacionadas con la edad en la concentración sérica de AMH en 60, 80 y cerdas de 100 días. Además, en las novillas se demostró que concentraciones más altas de AMH se asociaron con edades más jóvenes en la pubertad¹⁰.

Se ha sugerido que la fertilidad de la hembra está influenciada por varios factores, incluido el tamaño de la reserva folicular ovárica^{3,4}. La reserva ovárica es un término que se refiere tanto al número de folículos en la reserva folicular como a su calidad, y la disminución de la fertilidad de las mujeres asociada a la edad se relaciona con una reserva ovárica disminuida⁴. En la actualidad se considera a la AMH como un marcador del



Con el objetivo de determinar si existen asociaciones entre los niveles séricos de AMH y E2, y las respuestas al estro en las recrías, el presente estudio se llevó a cabo para probar la hipótesis de que los niveles circulantes de AMH son indicativos del potencial reproductivo de las cerdas tal y como indican las diferencias en la edad de la pubertad y la respuesta a las gonadotropinas exógenas.



tamaño de la reserva ovárica, que se produce solo en las células de la granulosa de los folículos en crecimiento en la mayoría de las especies^{3,5-7}.

Una de las funciones que se podría sugerir de la AMH es limitar el reclutamiento de folículos tanto inicial como cíclico, inhibiendo la expresión del receptor de la LH y la aromatasa inducida por la hormona folículoestimulante (FSH)¹¹.

Influencia de la AMH en la actividad de la aromatasa

Al influir en la actividad de la aromatasa, se puede suponer un efecto sobre la producción de estrógenos y, de hecho, se ha documentado una relación inversa entre las concentraciones séricas de estrógenos y AMH^{12,13}.

Materiales y métodos

Experimento uno

Para el experimento uno, se seleccionaron 200 cerdas Landrace x Yorkshire de 90 días de edad y un mínimo de 25 kg de peso corporal. Desde la selección hasta la detección de su primer estro, las cerdas se alojaron en grupos de seis en un sistema de alojamiento abierto con 2,0 m² por cabeza. Las cerdas se alimentaron en grupo con una dieta formulada para proporcionar 3200 kcal DE/kg y 15 % de proteína cruda, lo que permitió una ganancia de hasta 2,5 kg/cerdo/día, con suministro de agua *ad libitum* mediante chupetes. De los 150 a los 200 días de edad, las cerdas estuvieron expuestas directamente a los verracos maduros durante 15 min/día para estimular

el inicio y facilitar la detección de su estro puberal. Se obtuvieron muestras de sangre de todas las cerdas a los 90, 120, 150, 180 y 200 días de edad mediante venopunción yugular. El suero de las 30 cerdas más precoces y las 30 menos precoces, que presentaban celo a los 200 días, y las 18 cerdas que permanecieron en anestro a los 200 días se analizaron para determinar las concentraciones de AMH y estradiol. En la detección del primer estro, las cerdas se sometieron a un examen ovárico para determinar el número de folículos preovulatorios (>6 mm) utilizando una ecografía transcutánea en tiempo real.

Experimento dos

Para el experimento dos se seleccionaron 152 cerdas Landrace x Yorkshire. Aproximadamente a los 165 días y 100 kg de peso corporal, se tomaron muestras de sangre de todas las recrias y se procesaron las muestras como en el experimento uno para determinar la progesterona, confirmar el estado no cíclico y los niveles de AMH. Después, todas las primerizas recibieron una inyección intramuscular de 400 UI de eCG y 200 UI de hCG (PG600®, MSD Animal Health). A partir del 2 día posinyección, se proporcionó a las cerdas un contacto diario con los machos maduros hasta el día 10 para facilitar la detección del estro. Las cerdas que presentaban celo a los 7 días fueron examinadas por ecografía para determinar el número de folículos ovulatorios al igual que en el experimento uno. Las concentraciones séricas de progesterona se determinaron mediante ELISA¹⁴.



El estudio se llevó a cabo en una instalación comercial de 600 cerdas en el este de Tailandia.



Resultados

Experimento uno

En el experimento uno, las edades medias en la pubertad de las 30 cerdas precoces y de las 30 menos precoces fueron de $169,3 \pm 0,6$ días y $195,2 \pm 0,9$ días, respectivamente. Como se detalla en la *tabla 1*, las concentraciones séricas de AMH del grupo más joven a los 90, 120 y 150 días de edad fueron más altas que las de los grupos menos precoces y en anestro ($p < 0,05$), pero las diferencias no fueron evidentes a los 180 días y 200 días de edad. Las cerdas en anestro tenían valores de AMH en suero más bajos que los grupos más jóvenes y mayores en todas las edades ($p < 0,05$; *tabla 1*). Hubo correlaciones negativas significativas entre la edad al inicio de la pubertad y las concentraciones séricas de AMH a los 90, 120 y 150 días de edad (*tabla 2*).

En las cerdas más jóvenes, las concentraciones séricas de E2 se mantuvieron estables a los 90 y 120 días, fueron significativamente más altas a los 150 días y luego permanecieron estables hasta los 180 días (*tabla 1*). Se observó un patrón similar para las cerdas menos precoces en salir a celo, aunque el aumento no fue evidente hasta los 180 días (*tabla 1*), lo que dio lugar a una correlación significativa entre la edad en la pubertad y los niveles de E2 en suero del día 150 (*tabla 2*). En comparación con las cerdas que alcanzaron la puber-



krumanop/shutterstock.com



No hubo efecto de la edad puberal de las cerdas de reemplazo para el número de folículos preovulatorios; $16,5 \pm 2,2$ y $15,1 \pm 0,64$ en las cerdas más o menos precoces, respectivamente.

tad, las concentraciones séricas de E2 fueron más bajas ($p < 0,05$) en las cerdas en anestro en todas las edades estudiadas (*tabla 1*).

Niveles séricos hormonales	Edad (días)	Más precoces (n=30)	Más tardías (n=30)	Anestro (n=18)
AMG (ng/ml)	90	$12,5 \pm 1,1^{a,x}$	$9,8 \pm 1,2^{b,x}$	$7,6 \pm 1,2^{c,x}$
	120	$12,6 \pm 1,2^{a,x}$	$9,8 \pm 1,1^{b,x}$	$7,9 \pm 1,1^{c,x}$
	150	$12,9 \pm 1,1^{a,x}$	$10,1 \pm 1,1^{b,x,y}$	$8,4 \pm 1,1^{c,x}$
	180	$13,1 \pm 1,3^{a,x}$	$12,8 \pm 1,2^{a,x,y}$	$9,1 \pm 1,2^{b,x}$
	200	$13,8 \pm 1,2^{a,x}$	$13,0 \pm 1,4^{a,y}$	$9,1 \pm 1,4^{b,x}$
E2 (pmol/l)	90	$95,4 \pm 11,2^{a,x}$	$89,2 \pm 8,3^{a,x}$	$65,2 \pm 6,2^{b,x}$
	120	$100,2 \pm 8,5^{a,x}$	$94,5 \pm 5,2^{a,x}$	$68,4 \pm 9,1^{b,x}$
	150	$122,3 \pm 12,1^{a,y}$	$95,4 \pm 8,1^{b,x}$	$69,3 \pm 11,2^{c,x}$
	180	$130,2 \pm 9,5^{a,y}$	$124 \pm 10,2^{a,y}$	$70,6 \pm 6,7^{b,x}$
	200	$129,4 \pm 14,2^{a,y}$	$126,5 \pm 11,2^{a,y}$	$72,8 \pm 9,2^{b,x}$

^{a,b,c}Las filas con diferentes superíndices difieren $p \leq 0,05$;

^{x,y}Las columnas con diferentes superíndices difieren $p \leq 0,05$.

Tabla 1. Concentraciones séricas de hormona antimulleriana (AMH) y E2 de recrias a los 90, 120, 150, 180 y 200 días de edad.

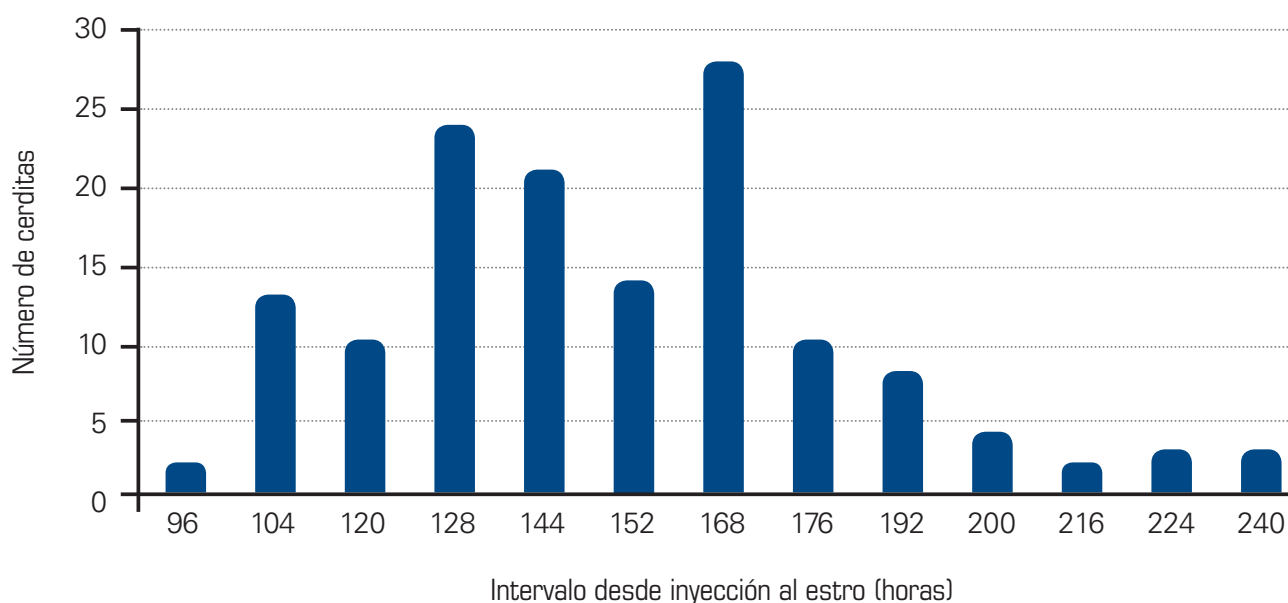
Niveles séricos hormonales	Edad (días)	r	Valor p
AMG (ng/ml)	90	-0,81	0,005
	120	-0,67	0,002
	150	-0,64	0,001
	180	-0,41	0,07
	200	-0,32	0,12
E2 (pmol/l)	90	0,31	0,18
	120	0,41	0,09
	150	-0,74	0,02
	180	0,32	0,16
	200	-0,51	0,08

Tabla 2. Correlaciones entre la edad de inicio de la pubertad y los niveles séricos hormonales a los 90, 120, 150, 180 y 200 días de edad (n=60).

Experimento dos

En el segundo experimento, se consideró que todas las cerdas eran prepúberes al comienzo del estudio. Las primeras 25 cerdas alcanzaron la pubertad entre las 96 y las 120 horas y las últimas 30 cerdas entre las 176 y las 240 horas (ver *figura*); 10 primerizas que-

daron en anestro. La concentración sérica media de AMH en las primeras 25 cerdas en mostrar celo fue mayor ($p < 0,02$) que en las últimas 30 cerdas ($13,6 \pm 1,2$ y $11,8 \pm 1,1$ ng/ml). Las primeras 25 cerdas también tenían más ($p < 0,001$) folículos preovulatorios que las últimas 30 cerdas ($13,3 \pm 1,3$ y $11,4 \pm 1,2$).



Distribución de los intervalos para la detección del celo en las cerdas después de la inyección de 400 UI de eCG y 200 UI de hCG (PG600®, MSD Animal Health).



Discusión

Los resultados demuestran una asociación negativa entre las concentraciones séricas de AMH y la edad de pubertad en las cerdas de reemplazo. Además, se ha sugerido que las cerdas que maduran más temprano son innatamente más fértiles o pueden experimentar más ciclos estrales previos a la reproducción, lo que da como resultado una fertilidad mejorada. También se ha observado que, si bien los aspectos de la localización inmunitaria de la AMH en los ovarios porcinos son comparables a los de otras especies, existen diferencias⁸. Sin embargo, actualmente es razonable suponer que la concentración de AMH circulante en las recrias prepúberes refleja el tamaño del conjunto de folículos antrales.

Los datos indican que, en las cerdas de maduración relativamente más temprana, los niveles circulantes de

AMH permanecieron sin apenas cambios entre los 90 y 200 días de edad. Esta ausencia de cambios respalda los datos publicados previamente en los que no se documentaron diferencias evidentes en la AMH circulante de las cerdas entre los días 60 y 180¹² o entre los días 80 y 160¹³.

En las cerdas de maduración tardía de este estudio la AMH sérica fue más baja que en las cerdas de maduración temprana hasta que los niveles aumentaron a partir del día 180. Se observó un patrón muy similar en la concentración sérica de E2: las cerdas que alcanzaron la pubertad a edades más tempranas demostraron una elevación de E2 a partir de los 150 días, mientras que en las cerdas de mayor edad se observó una elevación a los 180 días.

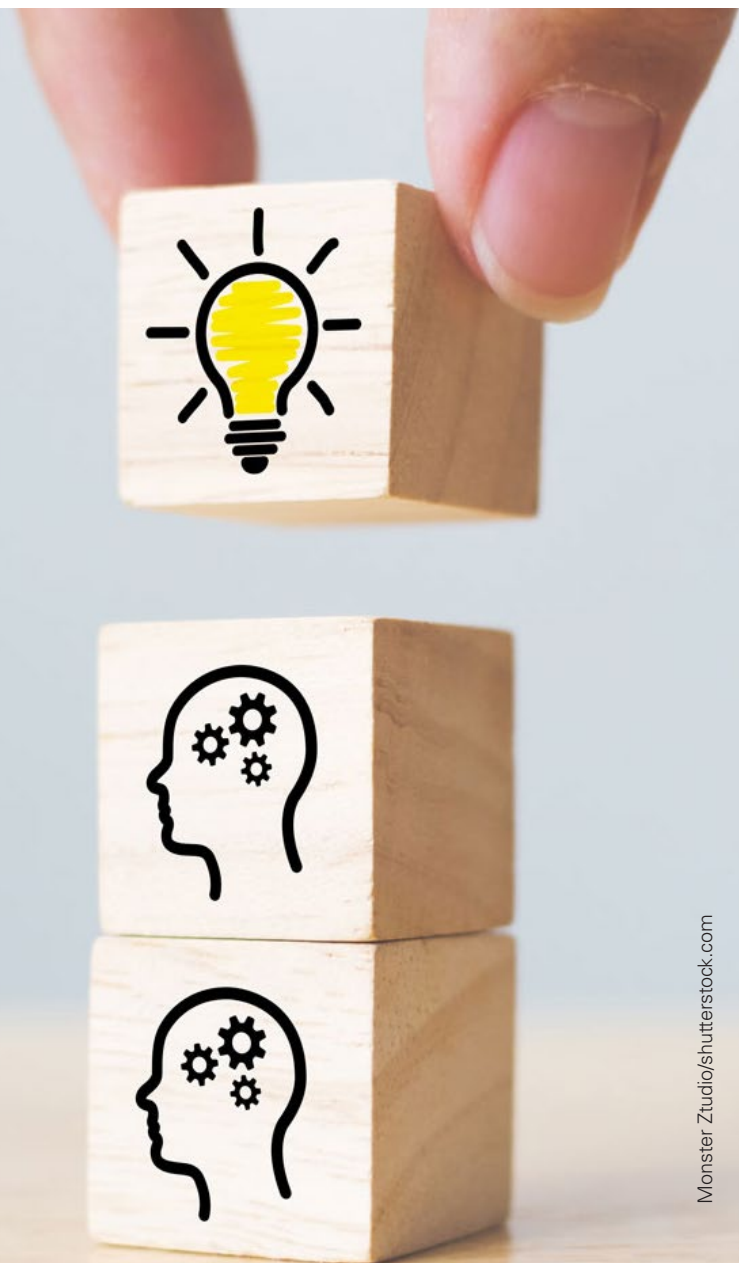
Aumento de E2

Cabe destacar que estos aumentos en suero de E2 ocurrieron a intervalos similares antes de la edad promedio de pubertad. Además, el aumento de E2 en suero detectado a los 180 días se asoció con un aumento de AMH en las concentraciones observadas en las cerdas que maduraban antes. Esto puede sugerir que los efectos inhibidores de la AMH sobre la actividad de la FSH¹¹, y por extensión a la producción de E2, disminuyen en el periodo peripuberal de las cerdas.

Aunque es especulativo, parece que se debe lograr un grado permisivo de madurez ovárica aún no definido antes de que ocurra la pubertad. Independientemente, el número de folículos ováricos preovulatorios no se vio influenciado por la edad en la pubertad.



Estos datos sugieren un vínculo entre las concentraciones de AMH circulantes prepúberes y la posterior fertilidad de las primerizas.





Puntos clave

1

Las concentraciones circulantes uniformemente más bajas de AMH y E2 en las cerdas destinadas a permanecer en anestro a los 200 días de edad sugieren que probablemente tenían grupos de folículos antrales más pequeños, lo que dio lugar a un fracaso para alcanzar los niveles de madurez ovárica necesarios para iniciar los ciclos estrales.

2

Los datos del experimento dos apoyan la asociación entre las concentraciones circulantes de AMH y la actividad ovárica. Se espera que la inyección de 400 UI de eCG y 200 UI de hCG (PG600®, MSD Animal Health) en las cerdas a los 165 días de edad induzca el estro.

Según los estándares comerciales, la respuesta al estro fue muy buena en 142 de las 152 cerdas tratadas (93,4 %) que presentaron signos de estro. Sin embargo, los intervalos desde la inyección hasta la detección del celo fueron variables e influenciados por las concentraciones circulantes de AMH.

Influencia de la AMH

Las cerdas que respondieron más rápidamente tuvieron niveles más altos de AMH. Esto indica que los niveles más altos de AMH están asociados con un conjunto de folículos ováricos más receptivo, una sugerencia respaldada por el mayor número de folículos preovulatorios observados en la detección del estro en las cerdas con la inyección más corta a los intervalos de celo. El impacto en la fertilidad de las primerizas de la AMH sérica más alta y el aumento de la respuesta ovárica a la estimulación exógena aún está por determinar.

Conclusión

Los datos apoyan la hipótesis de que los niveles circulantes de AMH son indicativos del potencial reproductivo de las cerdas de reemplazo, como lo indican las diferencias de edad en la pubertad espontánea y el estro y las respuestas ovulatorias a las gonadotropinas exógenas. Estos datos se refieren solo a la población de estudio, por lo que la generalización de un umbral de selección específico no es apropiada. Se necesita más trabajo en genética, rebaños y manejo para desarrollar esta medida. Sin embargo, si tiene éxito, su aplicación sería inestimable para la industria porcina mundial.

Bibliografía

1. Hughes, P.E.; Smits, R.J.; Kirkwood, R.N. Relationships among gilt and sow liveweight, P2 backfat depth, and culling rates. *J. Swine Health Prod.* 2010, 18, 301–305.
2. Patterson, J.; Foxcroft, G. Gilt Management for Fertility and Longevity. *Animals* 2019, 9, 434. [CrossRef]
3. Ireland, J.J.; Smith, G.W.; Scheetz, D.; Jimenez-Krassel, F.; Folger, J.K.; Ireland, J.L.H.; Mossa, F.; Lonergan, P.; Evans, A.C.O. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 2011, 23, 1–14. [CrossRef] [PubMed]
4. Grynnerup, A.G.; Lindhard, A.; Sorensen, S. The role of anti-Mullerian hormone in female fertility and infertility—An overview. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2012, 91, 1252–1260. [PubMed]
5. Kevenaar, M.E.; Meerasahib, M.F.; Kramer, P.; van de Lang-Born, B.M.; de Jong, F.H.; Groome, N.P.; Themmen, A.P.; Visser, J.A. Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology* 2006, 147, 3228–3234. [PubMed]



6. La Marca, A.; Stabile, G.; Arsenio, A.C.; Volpe, A. Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum. Reprod.* 2006, 21, 3103–3107. [CrossRef] [PubMed]
7. Appt, S.E.; Clarkson, T.B.; Chen, H.; Adams, M.R.; Christian, P.J.; Hoyer, P.B.; Wilson, M.E.; Kaplan, J.R. Serum antimullerian hormone predicts ovarian reserve in a monkey model. *Menopause* 2009, 16, 597–601. [CrossRef] [PubMed]
8. Almeida, F.R.C.L.; Costermans, N.G.J.; Soede, N.M.; Bunschoten, A.; Keijer, J.; Kemp, B.; Teerds, K.J. Presence of anti-Mullerian hormone (AMH) during follicular development in the porcine ovary. *PLoS ONE* 2018, 13, e0197894. [CrossRef]
9. Van Wettere, W.H.E.J.; Weaver, A.C.; Staveley, L.M.; Muller, T.L.; Hewitt, R.J.E.; Hughes, P.E.; Kirkwood, R.N. Prenatal and neonatal gilt management and anti-Mullerian hormone: Effects on the ovary and response to the boar. *Anim. Prod. Sci.* 2015, 55, 1515. [CrossRef]
10. El-Sheikh Ali, H.; Kitahara, G.; Takahashi, T.; Mido, S.; Sadawy, M.; Kobayashi, I.; Hemmi, K.; Osawa, T. Plasma anti-Müllerian hormone profile in heifers from birth through puberty and relationship with puberty onset. *Biol. Reprod.* 2017, 97, 153–161. [CrossRef] [PubMed]
11. Sacchi, S.; D'Ippolito, G.; Sena, P.; Marsella, T.; Tagliasacchi, D.; Maggi, E.; Argento, C.; Tirelli, A.; Giulini, S.; La Marca, A. The anti-Mullerian hormone (AMH) acts as a gatekeeper of ovarian steroidogenesis inhibiting the granulosa cell response to both FSH and LH. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2016, 33, 95–100. [CrossRef] [PubMed]
12. Steel, A.; Athorn, R.Z.; Grupen, C.G. Anti-Müllerian hormone and Oestradiol as markers of future reproductive success in juvenile gilts. *Anim. Reprod. Sci.* 2018, 195, 197–206. [CrossRef] [PubMed]
13. Steel, A.; Athorn, R.Z.; Grupen, C.G. Serum Concentrations of AMH and E2 and Ovarian and Uterine Traits in Gilts. *Animals* 2019, 9, 811. [CrossRef]
14. Tummaruk, P.; Suwimonteerabutr, J.; Singlor, J.; Pimpitak, U.; Puthong, S.; Komolpis, K. Correlation and agreement between serum and plasma progesterone concentrations in pigs as determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Thai J. Vet. Med.* 2018, 48, 157–158.