

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

DIRECCIÓN DE CARRERA: PECUARIA

**INFORME DE TRABAJO DE TITULACIÓN
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO**

**MODALIDAD:
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**TEMA:
EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE HORMONA
ANTIMÜLLERIANA SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR EN EL
CICLO ESTRAL EN VACAS BRAHMAN JÓVENES Y ADULTAS**

**AUTORES:
ESTHELA NATALI ALCÍVAR VÉLEZ
MILTON ORLEY ÁLVAREZ ARROYO**

**TUTOR:
DR. JORGE IGNACIO MACÍAS ANDRADE, Mg.**

CALCETA, DICIEMBRE 2019

DERECHOS DE AUTORÍA

ESTHELA NATALI ALCÍVAR VÉLEZ y **MILTON ORLEY ÁLVAREZ ARROYO**,
declaran bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría, que
no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional,
y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este
documento.

A través de la presente declaración cedemos los derechos de propiedad
intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria De Manabí Manuel
Félix López, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su
reglamento.

.....
ESTHELA N. ALCÍVAR VÉLEZ

.....
MILTON O. ALVÁREZ ARROYO

CERTIFICACIÓN DE TUTOR

DR. JORGE IGNACIO MACÍAS ANDRADE, Mg certifica haber tutelado el proyecto **EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR EN EL CICLO ESTRAL EN VACAS BRAHMAN JOVENES Y ADULTAS**, que ha sido desarrollada por **ESTHELA NATALI ALCÍVAR VÉLEZ Y MILTON ORLEY ÁLVAREZ ARROYO**, previa la obtención del título de Médico Veterinario, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN DE LA UNIDAD DE TITULACIÓN ESPECIAL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria De Manabí Manuel Félix López.

.....
DR. JORGE IGNACIO MACÍAS ANDRADE, Mg

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el trabajo de titulación **EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR EN EL CICLO ESTRAL EN VACAS BRAHMAN JOVENES Y ADULTAS**, que ha sido propuesta, desarrollada por **ESTHELA NATALI ALCÍVAR VÉLEZ Y MILTON ORLEY ÁLVAREZ ARROYO**, previa la obtención del título de Médico Veterinario, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria De Manabí Manuel Félix López.

.....
M.V. KAROLINA LÓPEZ RAUSCHEMBERG, Mg. Sc.

MIEMBRO

.....
M.V. ANDRÉS VERA CEDEÑO, Mg. Sc.

MIEMBRO

.....
M.V. DERLYS MENDIETA CHICA, Mg. Sc.

PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

Este logro se lo debo principalmente a Dios por permitirme llegar a él, a la ESPAM MFL por abrirme sus puertas a mis maestros y a mi tutor por ser parte de mi formación académica, a mi compañero de tesis por estar conmigo en cada parte de este proceso de titulación, nunca es demasiado tarde el agradecimiento a quienes no te abandonaron en los buenos y malos momentos y es aquí donde realmente demostramos a esas personas que valió la pena su esfuerzo, Mamina gracias por haber sido mi cómplice favorita, por tu amor sin medida, papi y mami sin ustedes no lo hubiera logrado, me daban un empujoncito todos los días para lograrlo, papito Roque gracias por ser otro padre para mí y apoyarme siempre que lo necesite, Pordocita y Ñaña Pamela gracias por su apoyo y su cariño desde que siquiera tengo memoria , tía Josefa por su cariño incondicional, a mis abuelos maternos, a mis hermanos y a las personas que a lo largo de mi vida fueron clave para llegar a mi vida profesional. Me siento tan agradecida por todo lo que tengo y lo que voy a tener porque sé que todas las cosas son bendiciones de Dios.

ESTHELA N. ALCÍVAR VÉLEZ

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios por haberme dado paciencia y sabiduría para culminar con éxito mi carrera universitaria.

A mis padres Higinio y Esperanza que con su esfuerzo y dedicación me ayudaron a culminar esta meta propuesta.

Le agradezco a la ESPAM MFL y a mis docentes por haber compartido sus conocimientos a lo largo de mi profesión.

MILTON O. ALVÁREZ ARROYO

DEDICATORIA

Te la dedico con todo mi amor y cariño a ti Mamina, por todo tu sacrificio y esfuerzo y por estar siempre presente en cada instante de mi vida, a mis padres por darme esta carrera por creer en mí, quienes con palabras de aliento nunca me dejaron decaer, a ti papito Roque porque fuiste quien me trajo a la ESPAM MFL y sin tu apoyo tampoco lo hubiera logrado, por tus consejos y tu confianza, a ti Ana María que has sido mi ejemplo de superación y que siempre podemos ir en constante mejora, al Nono por estar siempre a mi lado no solo como hermano sino también como amigo, a ti Belén porque mientras tenga vida te apoyare en cada decisión que tomes para que sigas siendo la mejor siempre, a mi familia que es lo que más amo en mi vida y a ti mi bebe por ayudarme a encontrar el lado dulce y no amargo de la vida, talvez en este momento no entiendas mis palabras pero eres el detonante de mi felicidad y cada logro será por y para ti.

ESTHELA N. ALCÍVAR VÉLEZ

DEDICATORIA

Se lo dedico a Dios por guiarme en el camino correcto.

A mis padres Higinio y Esperanza, a mis tíos Orley y Leidiana por ser mi fuente de motivación para llegar a mi meta.

A mi esposa e hija por ser mi complemento y apoyarme siempre al momento de tomar decisiones.

MILTON O. ALVÁREZ ARROYO

CONTENIDO GENERAL

CARÁTULA.....	i
DERECHOS DE AUTORÍA.....	ii
CERTIFICACIÓN DE TUTOR.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vii
CONTENIDO GENERAL.....	ix
CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	xiii
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	2
1.3. OBJETIVOS.....	5
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	5
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
1.4. HIPÓTESIS.....	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. COMPARACIÓN CON OTRAS ESPECIES.....	6
2.2. DINÁMICA FOLICULAR EN LA HEMBRA BOVINA.....	8
2.3. DINÁMICA FOLICULAR DURANTE EL CICLO ESTRAL.....	9
2.4. CRECIMIENTO FOLICULAR.....	9
2.4.1. FACTORES DE CRECIMIENTO FOLICULAR.....	9
2.5. HORMONAS DE LA REPRODUCCIÓN.....	10
2.5.1. HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH).....	10
2.5.2. OXITOCINA.....	11
2.5.4. HORMONAS GONADALES.....	13
2.5.4.1. ESTRÓGENOS.....	13
2.5.6. PROSTAGLANDINA F2 α	15
2.5.7. REGULADORES PEPTÍDICOS.....	15
2.6. CONTROL NEUROENDOCRINO DE LA REPRODUCCIÓN.....	16
2.7. HORMONA ANTIMÜLLERIANA.....	17

2.7.1. NIVELES SÉRICOS DE AMH PREVIOS A PROCESOS REPRODUCITIVOS EN MUJERES.....	18
2.7.2. ESTUDIOS DE LA AMH EN BOVINOS Y OVINOS.....	19
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO.....	21
3.1. UBICACIÓN.....	21
3.2. DURACIÓN DEL TRABAJO.....	21
3.3. FACTOR EN ESTUDIO.....	21
3.4. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	21
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
3.6. VARIABLES EVALUADAS.....	22
3.6.1. VARIABLES INDEPENDIENTES.....	22
3.6.2. VARIABLES DEPENDIENTES.....	22
3.7. PROCEDIMIENTO DEL TRABAJO DE CAMPO.....	22
3.7.1. MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	22
3.7.2. MANEJO DEL ENSAYO.....	23
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1. ANÁLISIS EXPLORATORIO DE DATOS.....	25
4.2. RELACIONES ENTRE VARIABLES.....	26
4.2.1. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN.....	26
4.2.2. ANÁLISIS DE REGRESIÓN.....	28
4.3. ANÁLISIS DE LA VARIANZA.....	30
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	39

CONTENIDO DE CUADROS

Cuadro 4.1. Resumen descriptivo de las variables	27
Cuadro 4.2. Coeficientes de correlación de las variables.	29
Cuadro 4.3. Resumen del análisis de varianza.....	31
Cuadro 4.4. Resumen del análisis de varianza.....	31

CONTENIDO DE FIGURAS

Gráfico 4.1. Número total de folículos en función de los niveles de la AMH en vacas Brahman	28
Gráfico 4.2. Número total de folículos de 2 – 4 en función de los niveles de la AMH en vacas Brahman.	29
Gráfico 4.3. Desdoblamiento de la interacción edad de las vacas*niveles de la AMH de la variable número total de folículos (barras de error corresponden al nivel crítico de Tukey al 5%).....	32
Gráfico 4.4. Desdoblamiento de la interacción edad de las vacas*niveles de la AMH de la variable número de folículos comprendidos entre 2 y 4 mm (barras de error corresponden al nivel crítico de Tukey al 5%).....	34
Gráfico 4.5. Desdoblamiento de la interacción edad de las vacas*niveles de la AMH de la variable tamaño del cuerpo lúteo (barras de error corresponden al nivel crítico de Tukey al 5%).....	36

RESUMEN

La presente investigación consistió en evaluar la relación entre los niveles de la Hormona Antimülleriana (AMH) y la dinámica folicular en vacas Brahman (N=20) de diferentes edades (<5 y ≥8 años). A todas las vacas se les extrajo 5 mL de sangre por punción yugular. Por motivos experimentales los niveles de AMH fueron subdivididas en rangos de 100-200, 200-300 y de 300-400 pg/mL. Todos los datos fueron analizados mediante InfoStat (2017) y las variables con ANOVA con un $P < 0,05$, y correlacionadas por el análisis de Pearson. El análisis de regresión entre los niveles de la AMH y el número total de folículos y número de folículos de 2 a 4 mm no mostraron diferencias significativas ($P=0,71$), ($P=0,69$) respectivamente. Se encontró relación entre el número total de folículos y los niveles de AMH ($P=0,02$). Además, se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de folículos de 2 a 4 mm y las edades por rango de AMH ($P=0,02$). En vacas menores de 5 años con niveles altos de AMH (300 a 400 pg/mL) se encontró el mayor número de folículos de 2 a 4 mm. Por otra parte, los cuerpos lúteos fueron de mayor tamaño en vacas mayores a 8 años ($8,65 \text{ mm} \pm 1,63$; $P=0,04$) en el momento de considerar a vacas con niveles de AMH medios (200-300 pg/mL). Se concluye que los niveles de AMH representan ser un buen indicador de la cantidad de folículos en vacas Brahman jóvenes, pero no en vacas mayores de 8 años.

PALABRAS CLAVE

Folículos, cuerpos lúteos, reserva ovárica, eficiencia reproductiva, raza.

ABSTRACT

The present investigation consisted of evaluating the relationship between the levels of the Antimüllerian Hormone (AMH) and the follicular dynamics in Brahman cows (N = 20) of different ages (<5 and ≥8 years). 5 mL of Blood was removed from all the cows by jugular puncture. For experimental reasons AMH levels were subdivided into ranges of 100-200, 200-300 and 300-400 pg / mL. All data was analyzed using InfoStat (2017) and the variables using ANOVA with a P <0.05, and correlated by Pearson's analysis. Regression analysis between AMH levels and total number of follicles and number of follicles from 2 to 4 mm showed no significant differences (P = 0.71), (P = 0.69) respectively. A relationship was found between the total number of follicles and AMH levels (P = 0.02). In addition, significant differences were found between the number of follicles from 2 to 4 mm and the ages by AMH range (P = 0.02). In cows under 5 years with high levels of AMH (300 to 400 pg / mL) the greatest number of follicles of 2 to 4 mm was found. On the other hand, the luteal bodies were larger in cows older than 8 years (8.65 mm ± 1.63; P = 0.04) when considering cows with average AMH levels (200-300 pg / mL). It is concluded that AMH levels represent a good indicator of the number of follicles in young Brahman cows, but not in cows older than 8 years.

KEYWORDS

Follicles, corpora lutea, ovarian reserve, reproductive efficiency, race.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El proceso reproductivo de las vacas constituye un aspecto fundamental para el desarrollo económico local, es por esta razón que la importancia de los temas de reproducción se hace cada vez más importante, ya que, por décadas, el significado clínico de la hormona Antimülleriana (AMH) ha estado limitado a su papel crítico en el desarrollo sexual fetal (Josso *et al.*, 1994). Sin embargo, en los últimos 15 años, esta ha incrementado su relevancia y ha surgido también como un marcador de función ovárica (Bhide *et al.*, 2012).

Mossa *et al.* (2013), reportaron que la capacidad de la hembra para producir ovocitos y mantener posteriormente el embrión son los principales elementos que reducen su eficiencia, ya que de ello depende la producción de nuevos terneros. Por ello, el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas para detectar hembras con fertilidad reducida puede suponer un gran avance en la industria ganadera.

Sin embargo, establecer los factores que afectan a la fertilidad se convierte en una tarea complicada debido a la complejidad de las interacciones existentes y a la dificultad de cuantificar y calificar las gónadas femeninas. Por ello, se ha definido el concepto de reserva ovárica, entendiéndose como el número de ovocitos sanos que posee un ovario. La reducción en estos contajes tiene un efecto directo en la función ovárica y en la concentración de gonadotropinas y progesterona, lo cual puede afectar directamente a la fertilidad (Mossa *et al.*, 2013).

Unger y Beraja (2010) investigaron que la AMH es producida por las células granulosas de los folículos preantrales (primarios y secundarios) y antrales pequeños, actúa inhibiendo el reclutamiento de los folículos primordiales, así como también la fase de crecimiento folicular dependiente de FSH, al expresarse exclusivamente en las células granulosas de los folículos no seleccionados, se convierte en un candidato ideal para representar tanto la cantidad como la calidad de la reserva de folículos ováricos.

Los perfiles endocrinos de gonadotrofinas, esteroides u otros compuestos, han demostrado ser de valor limitado en la predicción de la capacidad de las donantes de embriones en el ganado bovino; recientemente, la atención se ha centrado en la AMH, brindando nueva información sobre la población folicular y la respuesta a los tratamientos superovulatorios en bovinos, en esta especie, como en otras, la AMH expresa específicamente por células de la granulosa de folículos antrales pequeños y disminuye durante el crecimiento folicular terminal y atresia (Vales, 2016) .

Al realizar la presente investigación, se hace necesario plantear la siguiente interrogante ¿Existirá relación entre los niveles de AMH y la población folicular que permitan predecir la cantidad de folículos disponibles durante el ciclo estral de vacas Brahman?

1.2. JUSTIFICACIÓN

Las actividades reproductivas son fundamentales en el desarrollo productivo y económico de las actividades ganaderas, y es indispensable disponer de biomarcadores confiables como la AMH, que permitan predecir en estado individual de cada animal que son sometidos a procesos reproductivos (Mapletot *et al.*, 2002). Una de las biotecnologías reproductivas con mayor aportación al mejoramiento genético al hato, es la transferencia embrionaria.

Uno de los principales problemas que ésta enfrenta es la variabilidad en la respuesta superovulatoria y la recolección embrionaria entre un animal y otro, lo cual puede estar relacionado a factores externos como el medio ambiente o factores intrínsecos del animal (Mapletoft *et al.*, 2002) por ello se han buscado alternativas que permitan predecir la respuesta de vacas donadoras antes de iniciar un tratamiento superovulatorio, ya que el costo del mismo es elevado (Peña, 2015).

En la actualidad, la AMH es el mejor marcador endócrino de la reserva folicular ovárica y de la respuesta al tratamiento de estimulación ovárica en el ganado, se ha demostrado que la AMH tenía un alto grado de correlación con el recuento de folículos antrales de ovario, número de folículos y ovocitos viables en vacas Holstein (Peña, 2015).

Según Anduaga *et al.* (2015), la posibilidad que tiene una vaca de generar ovocitos depende de la cantidad de folículos antrales en el ovario. La reserva ovárica hace referencia a la cantidad de folículos antrales disponibles para la procreación y puede ser evaluada a través del recuento ecográfico de folículos y determinación de la AMH en animales cruce cebú (Brangus y Braford) y sintéticos (Bonsmara).

Continuando con Anduaga *et al.* (2015) refirieron que la AMH es secretada por células de la granulosa, está implicada en la inhibición del reclutamiento folicular y en reducir la sensibilidad de folículos a FSH, así mismo, la AMH no depende del ciclo estral y es mejor indicador del estado funcional del ovario que la inhibina β , FSH, LH y estradiol, en bovinos la AMH ha sido propuesta como predictora de la cantidad de folículos antrales y de la producción de ovocitos.

Mientras que es importante determinar la población folicular, por esta razón es posible cuantificar la población folicular del ovario mediante ecografías seriadas (Mossa *et al.*, 2014; Pfeiffer *et al.*, 2014), la presencia de elevadas concentraciones de AMH se relaciona positivamente con la reserva ovárica, lo que facilita la evaluación reproductiva del animal, para poder utilizar la AMH en la evaluación de las hembras reproductoras de manera práctica en las explotaciones, es necesario conocer qué otros factores pueden alterar dicha concentración hormonal (Ribeiro *et al.*, 2013).

De acuerdo a Mossa *et al.* (2013) la raza y la edad del animal se han descrito como un factor relacionado con la concentración de AMH, sin embargo, han existido dudas sobre la interferencia de los protocolos de sincronización (aplicados de rutina en muchas explotaciones) en dicha concentración, en un estudio elaborado por los citados autores en vacas lecheras en condiciones de manejo intensivo señaló que la determinación de la AMH durante el ciclo estral de la hembra no se vio influenciada por la sincronización hormonal exógena, estos datos señalan la posibilidad de medir la AMH en cualquier momento del ciclo, sin tener que cesar algún protocolo de IATF.

En caso de una patología quística en bovinos se observa un aumento sérico de la AMH durante la persistencia folicular, lo que traería como consecuencia una

inhibición en el desarrollo de folículos en distintas fases de crecimiento (Ricárdez, 2015).

Ante los posibles efectos de la AMH, la presente investigación consiste en realizar una comparación entre los niveles de la AMH y la población folicular sobre la dinámica ovárica durante el ciclo estral en vacas Brahman jóvenes y adultas.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles de AMH sobre la dinámica folicular en vacas Brahman

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estimar la población folicular de las vacas con relación a los niveles séricos de AMH bajo (100-200pg/mL), medio (200-300pg/mL) y alto (300-400pg/mL).

Comprobar la relación entre los niveles de AMH y la población de folículos pequeños y grandes durante el ciclo estral.

Asociar los niveles de AMH y la presencia de la ciclicidad o estructuras ováricas en los animales en estudio.

Valorar la relación entre la edad de los animales y los niveles de la AMH.

Comparar la población folicular de las vacas jóvenes y adultas y la correlación con los niveles de AMH en rangos.

1.4. HIPÓTESIS

Los niveles de AMH sanguíneo se correlacionan positivamente con la población folicular y la edad de las vacas Brahman durante el ciclo estral.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

Alrededor de una décima parte de la población mundial tiene algún grado de vinculación del sector ganadero y de cría, por tanto, los sistemas de producción pecuaria son considerados como la estrategia demográfica, social, económica y cultural más apropiada para mantener el bienestar de las comunidades especialmente las rurales, debido a que es la única actividad que puede simultáneamente proveer seguridad en el sustento diario, conservar ecosistemas, colaborar en las estrategias de poblamiento nacional y satisfacer los valores culturales y tradiciones, siendo una de las principales razones para la importancia de desarrollar diversas pruebas de AMH que permitan establecer procesos reproductivos adecuados del ganado bovino (Bittán, 2013).

2.1. COMPARACIÓN DE AMH CON OTRAS ESPECIES

La clonación de los genes de ratón (Münsterberg, 1991) y rata (Haqq, 1992) permite comparar la secuencia proteica de los precursores de la AMH en cuatro especies. El precursor bovino es el mayor, con 575 aminoácidos, seguido por el humano con 560, ratón con 555 y rata 553 residuos. Todos poseen una secuencia corta inicial, una péptida señal (Pepinsky, 1988).

La homología de AMH humana con la AMH bovina es del 78%, más marcada en el extremo C-terminal (96.3%) (Kanehisa, 1984). Es en esta zona C-terminal donde reside la homología entre los miembros de la superfamilia TGF- β , con un rango de entre el 20 y el 40% de los aminoácidos, esta región contiene los siete residuos de cisterna que forman los puentes disulfuro, además de otros grupos de aminoácidos muy preservados entre las moléculas de esta familia (Gelbart 1989), además refiere que paradójicamente, la mayoría de las diferencias están en el extremo C-terminal, que es mucho menos homólogo, en torno al 68% entre humana y bovina, aunque lo es más entre rata y ratón, con un 89% de homología.

En un estudio realizado en 39 mujeres homogéneas y normo-ovuladoras, con un índice de masa corporal normales (BMI), en las que se presentó periódicamente y diariamente la AMH en la periovulación, se describió una inflexión en la curva de la AMH, que desciende significativamente su concentración desde el día 4 pico preovulatorio de LH hasta el post-ovulatorio inmediato, una disminución en

la etapa temprana de la fase lútea indicaría que el efecto luteinizante influiría negativamente en la producción de AMH por las células de la granulosa, por lo menos durante un ciclo espontáneo (De caro y Sícaro, 2008).

En el caso de hipogonadismo, su diagnóstico se puede perder en la infancia y la niñez, si la atención es únicamente enfocada hacia las gonadotropinas y testosterona. Testículos pequeños son indicativos de reducción del número de células de Sertoli. Marcadores de células de Sertoli, como AMH sérica y la inhibina B, son más útiles en la evaluación de la función gonadal en comparación con la FSH y sin necesidad de pruebas de estimulación, y orientan el diagnóstico etiológico de hipogonadismo masculino en pacientes pediátricos (Rey *et al.*, 2011).

Almeida *et al.* (2011), midieron concentraciones séricas de la AMH en yeguas, durante el ciclo estral, gestación y con animales que presentaban tumores de las células de la granulosa. Así demostraron que en yeguas con ciclos normales y en gestación no hubo cambios séricos de esta hormona, en cambio en yeguas con tumores tuvieron una elevada concentración y una vez extirpado los tumores observaron un descenso notable en la concentración sérica. Así llegaron a la conclusión que la medición de AMH, fue un marcador útil para el diagnóstico de los tumores de la célula de la granulosa (GCT) en yeguas.

Una investigación realizada en una yegua en Arabia se reportó que la AMH y la inhibina- α tienen una mayor positividad en las células de la granulosa neoplásicas entre otros marcadores. De acuerdo con los resultados obtenidos de esa investigación llegaron a la conclusión que la AMH, inhibina- α , y GATA-4 pueden tener un papel como herramienta de diagnóstico para este tipo de tumores que se presentan recurrentemente en esta especie. Entonces estos marcadores se pueden utilizar como herramienta útil de diagnóstico, en este tipo de patologías (Evkuran *et al.*, 2013).

2.2. DINÁMICA FOLICULAR EN LA HEMBRA BOVINA.

Motta *et al.* (2011) reportaron además que durante cada onda de crecimiento folicular existe una población de folículos pequeños, medianos y grandes en cada ovario, de los cuáles uno se torna dominante, mediante un proceso de selección hasta el diámetro preovulatorio y generando la atresia de los folículos pequeños. En la dinámica folicular ovárica pueden ocurrir de una a cuatro ondas de crecimiento folicular (Pearson *et al.*, 1993) en la que existen diferencias entre los *Bos taurus* (taurino) y los *Bos indicus* (cebuíno).

Cada onda de desarrollo folicular involucra cuatro fases sucesivas. La fase de reclutamiento se define como un grupo o cohorte de folículos capaz de responder a la FSH para continuar su crecimiento. Como consecuencia, un grupo de 5 a 7 folículos (≤ 5 mm en diámetro) emerge del pool de folículos pequeños que son capaces de responder a las gonadotropinas, de lo cual uno de ellos será seleccionado (fase de reclutamiento) (Fortune, 1993). La fase de desviación ocurre cuando se inicia la diferencia en el crecimiento de los dos folículos más grandes, el tamaño folicular en el cual se observa la diferencia entre ambos folículos tiene 8,5 mm en promedio (Ginther *et al.*, 1997).

Con relación a la fase de dominancia, Del Valle (2008) refirió que cuando el folículo ovárico alcanza un diámetro aproximado de 10 mm, es señal que ese folículo escapó a la atresia y secreta productos (Inh y E2) capaces de inhibir el reclutamiento de una nueva onda folicular y el crecimiento de los folículos de su cohorte. Cuando el folículo dominante encuentra el ambiente hormonal adecuado (bajos niveles de P4), es capaz de ovular y como consecuencia se formará el cuerpo lúteo (CL).

Del Valle (2008), reseña, que cuando el folículo dominante llega a la fase de dominancia durante la fase luteal, en la cual existen altos niveles de P4, los niveles de LH no son suficientes para promover su crecimiento final y ovulación, este folículo dominante pierde su dominancia y permite el reclutamiento y la emergencia.

La maduración folicular ocurre en oleadas a lo largo del ciclo estral, que implican el reclutamiento de una cohorte de folículos una vez se detecta la onda folicular

ésta sigue creciendo hasta que dos días después se evidencia el crecimiento de un folículo que sobresale de la cohorte y se hace dominante con un diámetro aproximado de 8 mm (Camelo y Zorro, 2008).

Por último, refieren que una vez que se evidencia la dominancia folicular continúa una fase de crecimiento del folículo dominante hasta que alcanza su diámetro preovulatorio de 18 a 22 mm en ganado de leche y de 14 a 18 mm e incluso 10 mm en ganado de carne; éste se mantiene durante varios días.

2.3. DINÁMICA FOLICULAR DURANTE EL CICLO ESTRAL

Durante un ciclo estral las vacas Brahman pueden desarrollar una (6,7%), dos (90,0%) o tres (3,3%) ondas foliculares, la variación en el número de ondas foliculares también fue observada en hembras Gyr multíparas que desarrollaron dos (6,6%), tres (60,0%), cuatro (26,6%) o cinco (6,6%) ondas foliculares por ciclo, en vacas Cebú mestizas durante el primer ciclo estral postparto que formaron una (16,5%), dos (67%) o tres (16,5%) ondas foliculares por ciclo, en vacas Guzerá multíparas con dos (37,5%), tres (50%) o cuatro (12,5%) ondas foliculares por ciclo (Pearson *et al.*, 1993; revisado en Henao, 2010).

2.4. CRECIMIENTO FOLICULAR

Según una revisión efectuada por Espinoza *et al.* (2007), los ovocitos presentes en el ovario adulto se originan de un número definitivo de células germinales primordiales derivadas de la masa celular interna del blastocito en desarrollo, en los mamíferos, la hembra cuenta con una reserva de ovocitos que han interrumpido su crecimiento en los folículos primordiales, única fuente de ovocitos para ser ovulados durante su vida reproductiva, los folículos primordiales se forman durante la vida fetal en bovinos (130 días), ovinos y porcinos (70 días), o alrededor del nacimiento en roedores.

2.4.1. FACTORES DE CRECIMIENTO FOLICULAR

La foliculogénesis como eje fundamental del folículo ha sido estudiada desde hace mucho (Philip, 2003); y sin embargo hasta nuestros días todavía son un enigma muchos de los procesos que allí se dan, estudios recientes indican que hay unos factores, en su mayoría péptidos, los cuales se originan a partir de las

células foliculares y de manera autocrina y paracrina intervienen en el proceso de crecimiento y diferenciación folicular.

El mismo autor señala que estos factores actúan estimulando o inhibiendo acciones y dentro de los factores estudiados hasta el momento se han reportado a la inhibina, activina, follistatina, factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IG), factor de crecimiento similar a la insulina unido a proteínas (IGFBP), factor transformante de crecimiento (TGF alfa y beta), factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), factor 9 de crecimiento y diferenciación (GDF 9), proteína 15 morfogenética del hueso (BMP15).

Velázquez y Mendieta (2015) manifiestan que no sólo es la foliculogénesis el resultado de múltiples influencias, sino que es un proceso en el cual un mismo elemento de regulación puede participar de manera diferente, dependiendo del estado de desarrollo, no únicamente del folículo en sí, sino también de otros folículos previamente desarrollados dentro del ovario.

2.5. HORMONAS DE LA REPRODUCCIÓN

Gutiérrez (2008) ha determinado que en relación con las hormonas de reproducción bajo condiciones ideales, una vaca tiene el potencial de producir una cría al año o un intervalo entre partos igual a 12 meses. Para poder lograr este índice, las vacas deben concebir antes de los 100 días después del parto; sin embargo, las vacas en el trópico presentan alta incidencia de anestro postparto que prolongan los intervalos parto celo y parto concepción, afectándose considerablemente la eficiencia reproductiva.

Una de las herramientas más utilizada para el control del anestro postparto en climas tropicales ha sido el uso de hormonas; sin embargo, es importante recordar que el uso de los tratamientos hormonales en estos sistemas siempre debe ser secundario a los planes de mejoramiento general, como el manejo, la alimentación y la sanidad (Gutiérrez, 2008).

2.5.1. HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH)

La GnRH es un decapeptido sintetizado y almacenado en el hipotálamo, y transportado a la hipófisis mediante el sistema portal hipofisiario. Aunque la

GnRH desaparece rápidamente de la circulación, existen análogos más potentes (Deslorelin y Buserelin), con tasas de desaparición más lentas y mayor afinidad de unión a receptores hipofisarios de GnRH. La GnRH provoca la liberación de una oleada de LH que induce la ovulación de folículos maduros, para el tratamiento de quistes foliculares ováricos, y por su acción luteoprotectora, para reducir las pérdidas embrionarias durante la gestación (Pursley et al. 1995).

La GnRH actúa sobre receptores específicos de la adenohipofisis estimulando la liberación de FSH y LH, la FSH actúa sobre las células foliculares en el ovario estimulando la producción de estrógenos y el crecimiento y desarrollo del folículo, en respuesta a la LH desaparece el folículo dominante de la onda folicular en curso ya sea por ovulación y formación de un nuevo cuerpo lúteo o atresia (Fernández, 2003).

2.5.2. OXITOCINA

Los estudios desarrollados por Lee *et al.* (2009) describen que la oxitocina es una hormona nonapeptídica mejor conocida por su participación en la lactancia y el trabajo de parto, está constituida por nueve aminoácidos (cisteína, tirosina, isoleucina, glicina, asparagina, cisteína, prolina, leucina y glicina), un grupo amino terminal y un puente de azufre entre las dos cisteínas. La estructura de la oxitocina es muy similar a otro nonapéptido llamado vasopresina, que difiere de la primera en solo dos aminoácidos. Como resultado de la duplicación de genes, el gen de la oxitocina se localiza en el mismo cromosoma que la vasopresina (cromosoma 20).

La oxitocina es un octapéptido producido en los núcleos Supraóptico y Paraventricular del hipotálamo y es almacenado y liberado de la Neurohipófisis. Esta hormona presenta varias acciones fisiológicas, entre estas se destacan el efecto galactogogo, la inducción del parto y la acción en el transporte del semen en los genitales de la hembras (Reeves, 1987).

Carmichae *et al.* (1987), reportan que es una hormona y un neuropéptido, sintetizada por células nerviosas neurosecretoras magnocelulares en el núcleo supraóptico y el núcleo paraventricular del hipotálamo, de donde es transportada por su proteína transportadora, neurofisina, a lo largo de los axones de

las neuronas hipotalámicas hasta sus terminaciones en la porción posterior de la hipófisis (neurohipófisis), donde se almacena y desde donde es segregada al torrente sanguíneo.

2.5.3. HORMONAS GONADOTRÓPICAS O GONADOTROPINAS

Las gonadotropinas o gonadotrofinas son una serie de hormonas secretadas por la hipófisis (glándula pituitaria), gracias a la hormona liber-RH, y que están implicadas en la regulación de la reproducción en los vertebrados. Hay tres gonadotropinas: la hormona luteinizante (abreviada HL o LH), la hormona estimulante del folículo (abreviada HFE o FSH) y la gonadotropina coriónica humana (abreviada GCH o HCG) (Llusiá, 1995).

2.5.3.1. HORMONA LUTEINISANTE (LH)

Las gonadotropinas LH también denominada luteotropina, son glucoproteínas que se sintetizan y liberan en las células cianófilas del lóbulo anterior de la hipófisis, bajo la influencia de la GnRH. La acción de las gonadotropinas se ejerce, como se desprende de su nombre a nivel de las gónadas estrógeno y P4 en la hembra, testosterona en el macho (Illera, 1994).

Peters *et al.* (2004) informan que la LH aumenta la síntesis de progesterona a partir del cuerpo lúteo preparando al útero para la implantación del embrión disminuyendo el tono miometrial, aumentando la viscosidad del mucus y cerrando el canal cervical; además, del pico preovulatorio que inducirá la activación del ovocito para que continúe la meiosis.

Este hecho puede tener importancia cuando se relaciona con el estrés y con la consecuente secreción de opioides endógenos; por ejemplo, durante los primeros días postparto por efecto del amamantamiento sobre la inhibición de la función reproductiva (Williams *et al.*, 1996).

2.5.3.2. HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH)

La super estimulación con FSH exógena puede incrementar la respuesta ovárica si se aplica al inicio de la onda folicular. Al sincronizar la onda folicular se usa una combinación de progesterona (P4) y estradiol (EB) originando la emergencia de una nueva onda folicular 4 días después. Es importante conocer la historia

reproductiva y el celo previo al inicio del tratamiento superovulatorio ya que podría mejorar la producción de embriones (Ake, 1998).

La hormona folículo estimulante durante la fase folicular temprana y la intermedia, induce en las células de la granulosa el desarrollo de receptores para la LH marcando el desarrollo folicular; por lo que, en estas fases la LH junto con la FSH sostienen el desarrollo y crecimiento folicular (Erickson *et al.*, 1979).

La FSH, conjuntamente con la LH estimulan la síntesis de estradiol e inhibina en las células tecaes de los folículos en desarrollo, que a su vez actuarán asociadas suprimiendo la liberación de FSH por la hipófisis, en las mujeres después de la menopausia, la secreción de FSH aumenta notablemente pasando por filtración renal y llegando a la orina con el nombre de gonadotrofina menopáusica humana (hMG), que es comercializada como hormona para inducir la súper ovulación en mujeres y animales (Peters *et al.*, 2004).

2.5.4. HORMONAS GONADALES

Las hormonas gonadales pertenecen al grupo de las hormonas esteroideas caracterizada químicamente por poseer un núcleo tetracíclico, el ciclopentanoperhidrofenantreno y bajo condiciones fisiológicas ejercen múltiples efectos en el organismo, actúan especialmente sobre los órganos sexuales accesorios e influyen en los caracteres sexuales secundarios (Henricks y Mayer, 1977).

2.5.4.1. ESTRÓGENOS

Los estrógenos naturales son sustancias esteroideas muy relacionadas químicamente con las hormonas sexuales masculinas y hormonas de la corteza adrenal (Booth y McDonald, 1988). El principal estrógeno natural en las hembras de mamíferos corresponde al 17 Estradiol, producido en los folículos antrales del ovario (Arrau, 1984). Los estrógenos están muy relacionados químicamente con las hormonas sexuales masculinas y hormonas de la corteza adrenal (Booth y McDonald, 1988). El principal estrógeno natural en las hembras de mamíferos corresponde al 17 ión negativa sobre el centrotónico y positivo sobre el centro cíclico (Schoenemann *et al.*, 1985).

Entre los efectos de esta hormona se encuentran los cambios en los depósitos de grasa corporal, el desarrollo y crecimiento mamario, la estimulación de la proliferación celular del útero, trompas de Falopio y epitelio vaginal, la maduración de los ovarios y la producción de hormonas esteroides durante la fase luteal del embarazo (Tallera *et al.*, 1998 citado por Sherwood, 2008). Asimismo, también se encuentran implicados en el control de la conducta sexual femenina a nivel del sistema nervioso central (Freeman, 2006).

Las células de la teca y granulosa encontradas dentro y alrededor del folículo en crecimiento actúan en conjunto para la producción de estrógenos, las células de la teca producen andrógenos que se difunden dentro de las células de la granulosa donde son convertidos en estrógenos, después de la ruptura, las células de la granulosa se convierten en células luteales grandes, formando las principales células de secreción de progesterona del cuerpo lúteo (Martínez, 2005).

2.5.4.2. PROGESTERONA (P4)

Bearden y Fuquay (1982), agregan que la P4 mantiene la preñez por inhibición de las contracciones uterinas y promoción del desarrollo glandular en el endometrio y promover el desarrollo alveolar de las glándulas mamarias. Además, agrega que tiene acciones sinérgicas los estrógenos y los progestágenos en la preparación del útero para la preñez y las glándulas mamarias para la lactancia.

La P4 natural tiene una vida media muy corta, apenas entre 3-4 minutos, lo que implica la necesidad de utilizar altas dosis. Una alternativa es imitar la fase luteal del ciclo, utilizando progestágenos o análogos de la P4, los cuales requieren dosis menores, sin producir efectos secundarios (Gutiérrez, 2008).

Según Asprón (2004) menciona que la P4 suprime el desarrollo completo de los folículos y la secreción de estrógenos, niveles altos de esta hormona y bajos de estrógenos evitan que la vaca presente celo, las funciones de estrógenos y progesterona no siempre son antagónicas y en algunos procesos actúan juntas, la relación de concentración estrógenos/ progesterona determina el inicio y

duración de la conducta estral, el desarrollo uterino es iniciado por los estrógenos y completado por la progesterona.

Asprón (2004) reporta que los estrógenos causan contracción uterina cerca del momento del celo y la ovulación para ayudar al transporte espermático, la progesterona elimina la contracción uterina que podría afectar la preñez, hace que se forme tejido secretor (alveolos) de la glándula mamaria, lo que hace evidente la importancia de esta hormona es la regulación del ciclo estral.

2.5.6. PROSTAGLANDINA F2 α

La F2 α ha sido el tratamiento comúnmente utilizado para la sincronización del celo en bovinos (Odde, 1990). Los primeros estudios mostraron que la madurez del CL en el momento del tratamiento con F2 α influenciaba la respuesta luteolítica y que la F2 α no inducía la luteólisis de manera efectiva durante los primeros 5 a 6 días después del celo. Además, en los bovinos en los que la luteólisis no se producía, el comienzo del celo se distribuía por un periodo de 6 días (Macmillan y Henderson, 1984).

Las prostaglandinas se pueden sintetizar a partir del ácido araquidónico por la acción de diferentes enzimas como ciclooxigenasas, lipoxigenasas, el citocromo P-450, peroxidasas, etc., el mecanismo durante el cual la PGF-2^a llega del endometrio al ovario en los rumiantes es único, ya que al ser liposoluble se difunde desde las paredes de la vena útero ovárica a la arteria ovárica (Adams, 2001).

2.5.7. REGULADORES PEPTÍDICOS

Martínez (2005) describe que los reguladores peptídicos son producidos en la teca y en la granulosa, tienen como fin potenciar los resultados de las gonadotropinas en la granulosa del folículo preantral, son glicoproteínas con acción auto, para y endocrina.

2.5.7.1. INHIBINA

Aunque el término inhibina fue propuesto originalmente en 1932 para referirse a una sustancia contenida en los extractos acuosos testiculares, que era capaz de evitar la hipertrofia hipofisaria y la formación de las denominadas células de

castración en la pituitaria, y que sugería por tanto la existencia de una interrelación entre la hipófisis y las gónadas (McCullagh, 1932), el uso contemporáneo del término hace referencia a un regulador específico de la secreción de hormona foliculoestimulante (FSH).

2.5.7.2. ACTIVINA

La activina es un dímero compuesto por dos subunidades beta idéntica o muy similar. La inhibina también es un dímero en donde la primera componente es una subunidad beta similar o idéntica a la subunidad beta en la activina. Sin embargo, a diferencia con la activina, la segunda componente del dímero inhibina es más una lejanamente-relacionada subunidad alfa (Burger y Igarashi 1988).

2.6. CONTROL NEUROENDOCRINO DE LA REPRODUCCIÓN

López (2012) indica que el control de la función reproductora requiere una regulación precisa, cuantitativa y temporal del eje hipotalámico hipofisario gonadal. Ciertos núcleos liberan hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) con un patrón pulsátil, se trata de un decapeptido sintetizado por las células peptidérgicas hipotalámicas de la eminencia media, cuya secreción se halla bajo fuerte control, la secreción de GnRH es pulsátil, siendo dichos pulsos infrecuentes e irregulares, altamente controlados por la retroalimentación de las gonadotropinas.

Al comienzo de la fase folicular, los folículos inmaduros secretan pequeñas cantidades de estrógenos que inducen efecto de retroalimentación negativa en el hipotálamo e hipófisis, provocando la secreción tónica de FSH y LH. Cuando uno de los folículos alcanza la fase de folículo dominante, el aumento sostenido de los niveles circulantes de estrógenos estimula el centro cíclico produciendo la secreción del pico de LH, este pico desencadena la maduración final, ovulación y luteinización folicular (Atuesta y Gonella, 2011).

Ascanio (2009) describe que, además, el folículo dominante secreta grandes cantidades de inhibina, que actúa en la hipófisis inhibiendo la secreción de FSH, sin alterar la secreción de LH, produciéndose la atresia de los restantes folículos,

la ovulación determina el final de la fase folicular y el comienzo de la fase lútea del ciclo.

En elevada concentración de progesterona, producida por el cuerpo lúteo, junto con la baja concentración de estrógenos; ambas, originan nuevamente la retroalimentación negativa de forma que las gonadotropinas retroceden a los niveles basales. La luteolisis se produce por la secreción de PGF2 α del endometrio no gestante, provocando la disminución en los niveles sanguíneos de progesterona al mismo tiempo que se inicia un nuevo ciclo (Ascanio, 2009).

2.7. HORMONA ANTIMÜLLERIANA

Dentro del proceso reproductivo de la vaca la AMH cumple un papel fundamental, por lo que Godoy *et al.* (2012) reportan que la AMH, también llamada sustancia inhibidora de Müller, pertenece a la súper-familia del factor de crecimiento transformante-p (TGF-p) y se considera un factor de crecimiento local y de diferenciación celular, esta hormona sólo se produce en el ovario por las células de la granulosa que rodean a los folículos antrales, preantrales y a los folículos pequeños, por esto se cree que las concentraciones séricas de AMH son reflejo de la reserva ovárica y de la cohorte de folículos pequeños en desarrollo.

Las investigaciones más recientes demuestran que las concentraciones séricas de AMH tienen mayor sensibilidad para determinar la reserva ovárica en mujeres mayores de 35 años, y mayor relación con el número de folículos antrales, y utilidad en los ciclos de inducción ovárica controlada, en comparación con las concentraciones de FSH, estradiol e inhibina B (Godoy *et al.*, 2012).

Sowers *et al.* (2008) concluye que los niveles séricos de la AMH reflejarían el pool de folículos ováricos, de ahí su potencial como marcador de la cantidad y calidad de estos, descenden progresivamente con la edad, llegando a ser indetectables en la menopausia, por lo que su medición puede usarse para predecir la misma.

Fanchin *et al.* (2003) hacen referencia que, aunque el papel de la AMH es controvertido, datos recientes sugieren que puede actuar como un modulador

del reclutamiento folicular y como regulador de la esteroidogénesis ovárica, se sabe que la AMH tiene efecto inhibitor en el reclutamiento folicular actuando sobre las células de la granulosa, hecho que también se demuestra por la mayor sensibilidad de las células de la granulosa a la FSH en ausencia de AMH tanto *in vivo* como *in vitro*.

Wachs *et al.* (2007) manifiestan que los niveles de AMH séricos parecen ser el mejor marcador hormonal de reserva ovárica ya que se correlacionan directamente con la proporción de folículos primordiales; sin embargo, su valor predictivo no es absoluto, con los consecuentes resultados de falsos positivos y negativos especialmente los primeros.

2.7.1. NIVELES SÉRICOS DE AMH PREVIOS A PROCESOS REPRODUCUTIVOS EN MUJERES.

Dentro de los niveles séricos Giulini *et al.* (2007), los bajos niveles de AMH entre 0,7 y 0,75 ng/mL, en pacientes que se van a someter a tratamientos de reproducción asistida pueden predecir mala respuesta, más que posibilidad o no de embarazo con una tasa de falsos positivos del 10-20%. Se han publicado tasas de nacimientos de 15% en mujeres con niveles de AMH < de 0,7 ng/mL, cifras bastante elevadas para estas pacientes, lo que sugeriría que solo aquellas mujeres con muy mal pronóstico de respuesta (AMH entre 0,1-0,35 ng/mL) debería planteárseles rechazar el tratamiento.

Según Sighinolfi y Radi (2010) los niveles séricos de AMH como test de reserva folicular podría ser útil, siempre que se use un punto de corte bajo, esto con el objeto de minimizar los falsos positivos. Parece ser que los valores muy bajos de AMH son raros en mujeres jóvenes, siendo más frecuentes en mayores edades, lo que indicaría que solo la edad por sí misma podría identificar a la mayoría de las pacientes con posibilidad de cancelación de ciclo por ausencia de respuesta ovárica.

Nelson *et al.* (2007) concluyen que la AMH es el marcador sérico que puede determinar la cantidad y actividad de los folículos que se encuentran en los primeros estadios madurativos y por lo tanto el que mejor predice la reserva folicular.

Pizzi *et al.* (2015) manifiestan que la AMH producida en mayor cantidad por las células de la granulosa de pacientes con síndrome de ovario poliquístico también está relacionada por su acción paracrína con el hiperandrogenismo ovárico y probablemente interfiera con la aromatización de andrógenos inducida por FSH, lo que contribuye a la detención del desarrollo folicular observado en estas pacientes.

2.7.2. ESTUDIOS DE LA AMH EN BOVINOS Y OVINOS

2.7.2.1 BOVINOS

Diferentes estudios realizados en bovinos muestran la relación que tiene la AMH sobre la fertilidad. Ireland *et al.* (2008) reportaron en un estudio, que la variación en el conteo de folículos antrales durante las olas foliculares está muy asociada con alteraciones en las concentraciones circulantes de AMH.

Souza *et al.* (2015) concluyen que la relación existente entre la AMH y la superovulación en vacas se notó que estuvo altamente asociada con la respuesta superovulatoria y con el potencial de embriones, y llegaron a la conclusión que esta hormona podría convertirse en un método práctico y útil para predecir la repuesta folicular y la capacidad superovulatoria de cada vaca.

Tal situación permitiría mejorar la eficiencia de los programas de transferencia de embriones en ovulaciones múltiples en hatos lecheros. De modo contradictorio, Díaz *et al.* (2013) manifiestan que en caso de una patología quística en bovinos se observa aumento sérico de la AMH durante la persistencia folicular, lo que traería como consecuencia inhibición en el desarrollo de folículos en distintas fases de crecimiento.

Ribeiro *et al.* (2014), publicaron que en vacas de 2 a 3 partos mostraron concentraciones más altas que las de un solo parto. Se observó que las vacas con menor concentración de AMH tenían menores tasas de preñez y mayor incidencia en pérdida de la gestación entre los días 30 y 65, también se observó que la AMH no tuvo una relación negativa con vacas que salían preñadas con protocolo de inseminación artificial a tiempo fijo que se les practicaban, mientras que en vacas que no salieron gestantes a dicha IATF y posterior unas fueron inseminadas nuevamente y otras por monta natural. De esta manera concluyeron

que los protocolos de IATF, podría tener alguna implicación en la anulación positiva que tiene la AMH sobre la fertilidad.

Jiménez *et al.* (2015) llegaron a la conclusión, de que una sola determinación en la concentración de AMH en novillas lecheras jóvenes, puede ser un método de diagnóstico para predecir la longevidad del hato y que también puede ser un marcador genético útil para mejorar los sistemas de crianza y mejorar la longevidad de las vacas lecheras. Por otro lado, Pfeiffer *et al.* (2014), mencionan que en vacas la determinación de la AMH durante el ciclo estral, no se vio influenciada por la sincronización hormonal exógena, estos datos señalan la posibilidad de medir la AMH en cualquier momento del ciclo, sin tener que cesar algún protocolo de IATF.

2.8. TÉCNICA PARA DETERMINAR AMH MEDIANTE ELISA

Rey *et al.* (2013) refiere que la empresa Beckman-Coulter ha descontinuado la comercialización del kit DSL y, aunque continúa comercializando el kit Immunotech desde 2009, se está reemplazando progresivamente por una versión de nueva generación conocida como AMH Gen II. Existe correlación positiva y significativa entre los resultados obtenidos por el ELISA Gen II y los previos ($r = 0,97$ con Immunotech y $r = 0,93$ con DSL).

Además, los ensayos empleados para medir la AMH parecen ser bastante confiables, existen cuidados recomendables en cuanto a la toma y conservación de la muestra, es conveniente centrifugar la muestra de sangre y separar el plasma o el suero y congelar de manera inmediata. La presencia de anticuerpos heterófilos, por ejemplo, en pacientes con enfermedades autoinmunes, puede provocar resultados falsamente elevados en la determinación de AMH sérica. Recientemente, se ha validado la utilidad de la cuantificación de AMH en gota de sangre seca, en papel de filtro como método mínimamente invasivo para la evaluación de la reserva ovárica.

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

La presente investigación se realizó en la finca El Sombrero, en el sitio El Sombrero, cantón Paján, provincia de Manabí, ubicada en Latitud: 80° 30' / Este 80° 15' de Longitud Oeste y Sur 1° 40' / S 1° 30' de Latitud Sur; a 450 Km de la ciudad de Quito. El campo constaba de condiciones climáticas tropicales, con precipitaciones anuales de 1000 a 2000 mm/año, con temperatura promedio de 24°C, humedad relativa anual de 87,0% y a una altitud de 110 metros sobre el nivel del mar (msnm). **Fuente:** (Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal del Cantón Paján, 2012).

3.2. DURACIÓN DEL TRABAJO

Esta investigación se inició el lunes 12 de febrero del 2018 y finalizó el viernes 29 de junio del 2018, con duración de 138 días.

3.3. FACTORES EN ESTUDIO

Edad de los animales y niveles de la AMH.

3.4. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Este trabajo corresponde a una investigación diagnóstica, sin embargo, se utilizó un diseño completamente al azar en arreglo factorial considerada dentro del análisis los factores A y B. Se seleccionaron 20 vacas de la raza Brahman clasificadas en dos rangos de edad: menores de 5 años y mayores de 8 años de edad, respectivamente, (Factor A). Posteriormente, por motivos experimentales se procedió a dividir los niveles sanguíneos de la AMH en tres rangos: 100 a 200, de 200 a 300 y 300 a 400 pg/mL (Factor B).

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó un análisis exploratorio de las variables bajo estudio y de relaciones funcionales a través del análisis de correlación de Pearson y análisis de regresión. Posteriormente, fueron analizadas por medio de análisis de varianza, para conocer la significancia probabilística de los distintos factores en estudio entre los que se incluyó la interacción. Todos los análisis de varianza (ANOVA) se efectuaron con el software InfoStat en versión libre (Di Rienzo *et al.*, 2016).

Previo al ANOVA, los valores de las características cuantificadas fueron examinados por las pruebas de normalidad de Wilk-Shapiro y la de homogeneidad de varianza de Bartlett por el programa ASSISTAT (Silva y Azevedo, 2016), hubo necesidad de transformar los datos en raíz cuadrada de $(X+1)$ para satisfacer supuestos para el análisis de varianza. El desdoblamiento de la interacción significativa para la variable objeto de análisis se realizó de acuerdo con el valor crítico de la prueba de Tukey al 5% de probabilidad.

3.6. VARIABLES EVALUADAS

3.6.1. VARIABLES INDEPENDIENTES

Edad de las vacas (años)

Nivel de concentración de AMH en suero sanguíneo ($\mu\text{g/mL}$).

3.6.2. VARIABLES DEPENDIENTES

Cantidad de folículos (N°).

Tamaño de folículos (mm).

Tamaño de cuerpos lúteos (mm).

Tamaño de ovario (cm^2).

3.7. PROCEDIMIENTO DEL TRABAJO DE CAMPO

3.7.1. MANEJO DEL EXPERIMENTO

3.7.1.1. NÚMERO Y TAMAÑO DE FOLÍCULOS OVÁRICOS

El número y tamaño de los folículos se determinó mediante ultrasonografía transrectal con ecógrafo (Mindray DP 50 VET®, Shenzhen, China) y transductor lineal de 7,5 MHz en modo B, se efectuó el conteo y medición de los folículos mediante el software del ecógrafo, también se realizó seguimiento de la onda folicular cada 24 horas durante todo el ciclo estral.

3.7.1.2. TAMAÑO DE CUERPO LÚTEO

Los cuerpos lúteos fueron determinados de la misma forma que los folículos, con la diferencia de que se efectuó el seguimiento 48 horas posterior a los signos de celo.

3.7.1.3. TAMAÑO DE OVARIO

Los ovarios de los animales fueron medidos de la misma manera, pero se efectuó al inicio del experimento.

3.7.1.4. NIVEL DE CONCENTRACIÓN DE AMH EN SUERO SANGUÍNEO

Las colecciones de sangre (4 mL) para los análisis de la AMH se efectuaron en todos los animales en estudio, las cuales fueron tomadas por punción de la vena yugular con agujas calibre 16 x 1 ½, para ello se utilizó tubos al vacío que contenían heparina de sodio (BD Vacutainer® NH; Becton Dickinson and Co.). Las muestras de sangre fueron enviadas y procesadas en el laboratorio UNIMIVET, para su respectiva evaluación en donde se las sometió a centrifugación [3.200 revoluciones por minuto (rpm) por 10 minutos a 4°C] y almacenadas inmediatamente a -20°C hasta su análisis por ELISA.

La prueba de ELISA para determinación de la AMH en suero sanguíneo de las vacas experimentales se efectuó con los kits de MOFA® para muestras de bovino (AMH ELISA simple test Kit Bovine Serum, 40 samples Max/Kit 21700/100) y el lector Infinite 200 PRO Multimode Multiplate Reader. Las concentraciones de AMH se midieron en muestras de 50 µL de suero. Las muestras congeladas de suero se descongelaron en baño maría justo antes de la prueba de ELISA, que previamente se sometieron a sacudido en vortex y centrifugadas a ≥ 3.200 rpm por 10 minutos a 4°C. Las muestras se mantuvieron por 12 horas a 4°C en presencia de un primer anticuerpo, luego por 1,5 horas a temperatura ambiente en presencia del segundo anticuerpo para luego hacer las lecturas.

3.7.2. MANEJO DEL ENSAYO

Se seleccionaron al azar 20 vacas, 10 de ellas entre 3 y 5 años, y 10 mayores de 7 años de una población de animales de alto valor genético de la raza Brahman. Las vacas jóvenes fueron las hembras entre 3 y 5 años (n=10) y hembras mayores de 7 a 9 años de edad (n=10).

Se realizó un protocolo de sincronización de la ovulación, para igualar el día cero del ciclo estral de todos los animales. Para ello se insertó un dispositivo con progesterona en el Día 0 (DIB® 0,5 Syntex, Argentina) y una dosis de 2 mg de

benzoato de estradiol (Gonadiol®; 1mg/mL; benzoato de Syntex®), el Día 8 se retiró el dispositivo, se inyectó 0,15mg de Ciclase®, el Día 9 se inyectó 1 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol®, Syntex). Luego del reinicio del ciclo estral farmacológico, todas las vacas fueron revisadas con ecografía transrectal por los métodos mencionados con anterioridad en esta investigación, los Días 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 posteriores a la inserción del dispositivo de P4. Todas las determinaciones sanguíneas fueron tomadas en el día que inició el protocolo de sincronización.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS EXPLORATORIO DE DATOS

Los datos de esta investigación permiten aceptar la hipótesis planteada, con respecto a la correlación positiva los niveles de AMH en las vacas jóvenes (< 5 años), por el contrario, se rechaza en lo relacionado con las vacas adultas (>7 años). En el Cuadro 4.1 se muestra las medidas de tendencia central (media y mediana), las medidas de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación) y el intervalo de confianza de las variables evaluadas durante la investigación.

La variable cantidad de folículos totales en las medidas de tendencia central (media y mediana) presentó valores de 5,50 y 5,57 respectivamente; para las medidas de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación) valores de 1,07 y 19,57%, respectivamente, con intervalo de confianza mínimo de 5 y máximo de 6,01. Mientras que para el número de folículos entre 2 a 4 mm, el valor promedio fue del orden de 5,36 y mediana de 5,48; la desviación estándar de 1,11 y el coeficiente de variación de 20,78%, con intervalo de confianza mínimo de 4,48 y máximo de 5,89.

En cuanto al número de folículos con diámetros comprendidos entre 4,1 a 7 mm los valores promedios fueron del orden de 1,29 mm, con mediana de 1,41 mm; desviación estándar de 0,29 y coeficiente de variación de 22,8; el intervalo de confianza de confianza fue mínimo de 1,15 y máximo de 1,43.

Para los folículos mayores de 7 mm se encontraron valores promedios de 1,33 mm, mediana de 1,41 mm; desviación estándar de 0,21 y coeficiente de variación 15,52 %; el intervalo de confianza correspondió a 1,23 mínimo y máximo de 1,42. La variable tamaño del cuerpo lúteo, presento valor promedio del orden de 9,24 mm, mediana de 10,50; con desviación estándar de 7,63 y el coeficiente de variación de 82,53%, con intervalo de confianza mínimo de 5,67 y máximo de 12,81 y finalmente en la variable tamaño de los ovarios, se encontró que la media fue de 2,75 mm, mediana de 2,85; desviación estándar de 0,51 y coeficiente de variación de 18,65%, su intervalo de confianza fue mínimo de 2,51 y máximo de 2,99, para el ovario derecho.

Mientras que para el ovario izquierdo la media fue de 2,78 mm, mediana de 2,64; desviación estándar de 0,72 y coeficiente de variación de 25,88%, su intervalo de confianza fue 2,44 mínimo y máximo de 3,12. Para los valores observados de los coeficientes de variación en las variables estudiadas se pueden constatar (cuadro 4.1) que la mayor dispersión la presentaron el tamaño del cuerpo lúteo y tamaño de ovario izquierdo.

Cuadro 4.1. Resumen descriptivo de las variables.

Estadístico	Número de folículos				Tamaño ovario		Tamaño Cuerpo Lúteo	
	Total	2-4 mm	4,1-7 mm	>7 mm	Derecho	Izquierdo		
Media	5,50	5,36	1,29	1,33	2,75	2,78	9,24	
Mediana	5,57	5,48	1,41	1,41	2,85	2,64	10,50	
Desv. Estándar	1,07	1,11	0,29	0,21	0,51	0,72	7,63	
Coef. de variación	19,52	20,78	22,80	15,52	18,65	25,88	82,53	
Intervalo de confianza (95%)	Min	5,00	4,84	1,15	1,23	2,51	2,44	5,67
	Max	6,01	5,89	1,43	1,42	2,99	3,12	12,81

Medidas de tendencia central, media, mediana y desviación estándar para número de folículos, folículos de 2-4 mm, folículos de 4,1-7 mm, folículos >7 mm, tamaño de ovarios (mm) y tamaño del cuerpo lúteo (mm) en vacas Brahman con diferentes niveles de AMH.

Ireland *et al.* (2007) encontraron una diferencia de siete veces en el número de folículos antrales de los bovinos adultos jóvenes, pero observó una consistencia dentro de los individuos para el número de folículos antrales dentro de las ondas foliculares. Similarmente, Hernández (2012), señala que la hembra bovina nace con aproximadamente 200 mil folículos, de los cuales muy pocos se activan o inician su crecimiento, lo que podría relacionarse con los datos encontrados en esta tesis, ya que la mayor parte de ellos sufre atresia en diferentes etapas de desarrollo. Los resultados de esta tesis podrían responder a la dinámica folicular que se genera de dos o tres ondas durante el ciclo estral y comienza con el reclutamiento de folículos antrales pequeños con tamaños de 2 a 4 mm (Borges *et al.*, 2001).

4.2. RELACIONES ENTRE VARIABLES

4.2.1. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

El análisis de correlación (Cuadro 4.2) no mostró relaciones entre las variables estudiadas, a excepción de la relación directa y altamente significativa entre el

número total de folículos y el número de folículos de 2 a 4 mm ($P=0,996$), lo cual indica que este último es el diámetro predominante del total de folículos de las vacas Brahman, independientemente de la edad y del nivel de la AMH.

A pesar de que los coeficientes de correlación de los niveles de la AMH no resultaron significativos entre de las variables estudiadas, los coeficientes para el número de folículos totales ($P=0,28$), el número de folículos de 2-4 mm ($P=0,28$) y de 4-7 mm ($P=0,22$), los cual se aproximaron al nivel crítico de significancia, por lo que no se descarta una relación entre dichas variables.

Cuadro 4.2. Coeficientes de correlación de las variables.

Variable	AMH (pg/mL)	Edad	Número de folículos			Tamaño ovario		Tamaño cuerpo lúteo	
			Total	2-4 mm	4,1-7 mm	>7 mm	Derecho		Izquierdo
AMH (pg/mL)	1								
Edad (años)	-0,046	1							
Número de folículos total	0,285	-0,140	1						
Folículos 2-4 mm	0,281	-0,128	0,996 **	1					
Folículos 4,1-7 mm	0,227	0,072	-0,060	-0,1267	1				
Folículos >7 mm	-0,209	-0,182	-0,354	-0,3852	-0,003	1			
Tamaño ovario derecho	0,242	-0,443	0,119	0,0739	0,114	0,403	1		
Tamaño ovario izquierdo	0,285	-0,232	0,081	0,0507	0,214	0,140	0,302	1	
Tamaño Cuerpo lúteo	0,086	0,049	0,004	-0,0001	0,237	-0,323	-0,393	-0,013	1

Número de folículos, folículos de 2-4 mm, folículos de 4,1-7 mm, folículos >7 mm y tamaño del cuerpo lúteo (mm) en vacas Brahman con diferentes niveles de AMH.

**Diferencia altamente significativa ($P=0,01$).

Estos resultados difieren con los reportados por Benyei *et al.* (2003), quienes encontraron que las concentraciones de la AMH están correlacionadas con el recuento de folículos antrales del ovario, el número de folículos y el número de ovocitos viables. Similarmente, Center *et al.* (2018) también encontraron correlaciones positivas entre la AMH en circulación y el número de folículos, y con el número de cuerpos lúteos. Por otra parte, Ireland *et al.* (2008) determinaron una correlación altamente positiva con las concentraciones de

AMH, el tamaño del ovario y el número total de ovocitos morfológicamente viables en los ovarios, lo que no estaría en concordancia con los datos de esta tesis, a pesar de la similitud en el biotipo animal con respecto a los de las bibliografías consultadas.

Contradictoriamente en relación al estudio de correlaciones entre otras variables, Ireland *et al.* (2008) encontraron que los animales con un recuento de folículos antrales bajo tienen ovarios más pequeños en comparación con vacas de la misma edad con recuentos más altos; además, los bovinos con recuento de folículos antrales bajo tienen una respuesta reducida a la superovulación (Singh *et al.*, 2004; Ireland *et al.* 2007) y concentraciones circulantes mucho más bajas de progesterona y un grosor endometrial reducido de 0 a 6 del ciclo estral (Jiménez -Krassel *et al.*,2009).

4.2.2. ANALISIS DE REGRESIÓN

El análisis de regresión entre los niveles de la AMH y el número total de folículos (Gráfico 4.1) mostraron diferencias significativas ($P=0,71$). La respuesta observada indica que ocurre incremento de la producción de folículos en la medida que aumentan los niveles de la AMH, en que se alcanzó el máximo valor cuando el nivel de la hormona se ubica alrededor de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$; a partir de ese nivel hormonal ocurre el descenso en la formación de folículos.

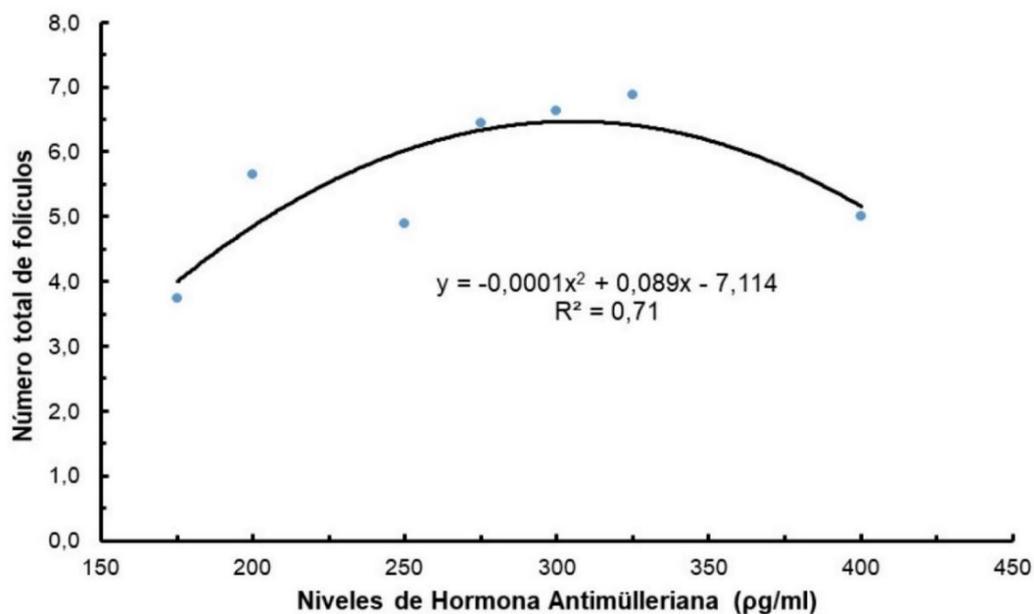


Gráfico 4.1. Número total de folículos en función de los niveles de la AMH en vacas Brahman

Se considera que la identificación de los niveles de folículos en función de la AMH en Brahman es fundamental para determinar un proceso reproductivo, adecuado, evidenciando la existencia de una correlación de estos niveles en los procesos reproductivos de esta especie.

De manera similar, cuando se realizó el análisis de regresión para establecer relaciones entre los niveles de la AMH y el número de folículos de 2 a 4 mm (Gráfico 4.2), con un coeficiente de regresión ($P= 0,69$) el cual resultó significativo al 5% de probabilidad. Dada la alta correlación entre las variables número total de folículos y número de folículos de 2 a 4 mm, el comportamiento de la curva de regresión para esta variable fue similar a la descrita para el número total de folículos.

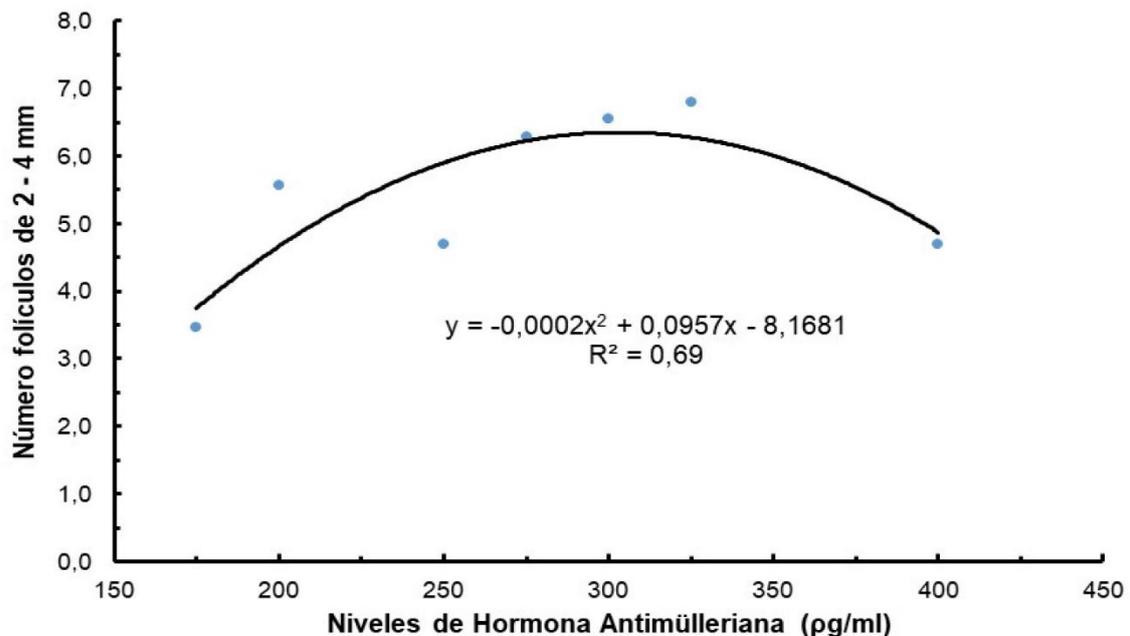


Gráfico 4.2. Número total de folículos de 2 a 4 en función de los niveles de la AMH en vacas Brahman.

Los puntos de máxima actividad para número total de folículos y número de folículos entre 2-4mm, calculados por la segunda derivada corresponden a valores de 320 y 315 respectivamente, donde se puede visualizar el mayor efecto hormonal. Melado (2014) señala que los estudios actuales orientan que la AMH constituye el principal marcador de la reserva ovárica. Los resultados de esta investigación muestran que la mayor actividad folicular se detectó en los rangos estudiados más elevados, por lo cual podría ser utilizada como marcador sérico para evaluar la reserva ovárica.

Estos resultados concuerdan con los de Ireland *et al.* (2008), quienes aseguran que el recuento de folículos antrales pueden ser marcadores fenotípicos fiables para predecir el número relativo de los folículos morfológicamente viables y ovocitos en los ovarios, y tal vez predecir la longevidad potencial reproductiva en el bovino. De forma similar, reportaron que la variación en el número de folículos antrales durante las olas foliculares está asociada a las alteraciones en las concentraciones circulantes de AMH. Hallazgos similares han sido reportados por Melado (2014) y Jiménez *et al.* (2015).

Con relación a los niveles óptimos de la AMH, los mayores resultados obtenidos en este estudio se lograron con los rangos superiores a 300 pg/mL en vacas menores de cinco años, lo cual concuerda con lo reportado por Del Río *et al.* (2017). Estos autores consideran a la AMH como un marcador fisiológico predictivo de la fertilidad postparto en vacas de raza Holstein sometidas a un protocolo de sincronización de la ovulación, puesto que vacas con niveles altos de AMH (>300 pg/mL) tuvieron mayor tasa de preñez después de la IA, requirieron menos servicios por concepción y tuvieron menos días abiertos en comparación con vacas con niveles normales (<300 pg/mL); probablemente debido a la disposición de una mayor cantidad de folículos por onda.

4.3. ANÁLISIS DE LA VARIANZA

En el Cuadro 4.3 se presentan los datos correspondientes al análisis de varianza de las medias de las variables en estudio, se observa que para las variables número total de folículos, número de folículos comprendidos entre 2 a 4 mm y el cuerpo lúteo solo se evidenciaron diferencias significativas entre la edad de las vacas y la AMH ($P=0,0265$), ($P=0,0229$), ($P=0,0432$) respectivamente en los datos transformados; mientras que para el caso de las variables número de folículos entre 4,1 a 7 y > 7mm no se reportaron diferencias tanto en los factores individuales como en las interacciones (Anexo N.1).

Cuadro 4.3. Esquema del análisis de varianza de datos transformados para cada una de las variables en estudio.

Fuente de variación	GL	Cuadrados Medios				
		Foliculos (mm)			Cuerpo lúteo (mm)	
		Total	2 a 4	4,1-7	> 7	
Edad	1	0,512 ^{ns}	0,492 ^{ns}	0,019 ^{ns}	0,004 ^{ns}	0,158 ^{ns}
Rangos AMH	2	0,449 ^{ns}	0,411 ^{ns}	0,034 ^{ns}	0,024 ^{ns}	0,871 ^{ns}
Edad*rangos AMH	2	4,282 ^a	4,757 ^b	0,004 ^{ns}	0,093 ^{ns}	6,472 [*]
Error	14	0,899	0,951	0,109	0,034	1,632
CV (%)		17,72	18,71	25,71	14,11	46,37

^{a,b}Superíndices distintos indican diferencias significativas (P=0,05); CV (%)= Coeficiente de variación. GL= Grado de libertad; *= interacciones entre las variables estudiadas. Variables número de foliculos, foliculos de 2-4 mm, foliculos de 4,1-7 mm, foliculos >7 mm y tamaño del cuerpo lúteo (mm), transformados en raíz (X+1) en vacas Brahman con diferentes niveles de AMH. ns=No significativo.

En el Cuadro 4.4 se puede observar la interacción edad de las vacas*nivel de la AMH (Edad*Rangos de AMH) donde se constata que para ambas variables los efectos significativos se observan para las vacas de edades menores de cinco años; sin embargo, el efecto significativo de la interacción para los cuerpos lúteos ocurre entre las vacas mayores de ocho años.

Cuadro 4.4. Resumen del análisis de varianza

Fuente de variación	GL	Cuadrados Medios		
		Número de foliculos		Cuerpo lúteo (mm)
		Total	2 a 4 mm	
Rangos AMH/<5 años	1	6,43 [*]	7,17 [*]	6,03 ^{ns}
Rangos AMH/>8 años	1	3,02 ^{ns}	3,15 ^{ns}	8,65 [*]
Error	14	0,89	0,95	1,63

Resultados de las interacciones significativas entre la edad y los niveles de la hormona para las variables número de foliculos, foliculos de 2-4 mm y tamaño del cuerpo lúteo (mm), transformados en raíz (X+1) en vacas Brahman con diferentes niveles de AMH.

Los resultados obtenidos concuerdan con los hallazgos de Gobikrushanth *et al.* (2018) quienes señalan que las concentraciones circulantes de AMH aumentan con un mayor reclutamiento folicular ovárico hasta los 5 años de edad (o la tercera paridad) y luego disminuyen como consecuencia del agotamiento gradual de la reserva ovárica.

NÚMERO TOTAL DE FOLÍCULOS

En la grafico 4.3 se presenta de forma gráfica los resultados correspondientes a la interacciones para las variables número de folículos (Cuadros 4.3 y 4.4), transformados en raíz ($X+1$). Se puede observar que entre las vacas menores de 5 años de edad los rangos de la AMH comprendidos entre 100-200 difieren de los observados a los >300 mientras que en el rango comprendido entre 200-300 $\mu\text{g/mL}$ y 100-200 $\mu\text{g/mL}$ no hay diferencias y son los rangos más altos de la hormona los que lograron el mayor número total de folículos.

Mientras que, en las vacas mayores de 8 años, no se evidenciaron diferencias entre los tres niveles hormonales para el número de folículos. Dentro de los tres niveles hormonales la sobreposición de las barras solo se detecta diferencias entre las vacas mayores de 8 años en relación con las menores de cinco años, en el mayor nivel de la hormona ($>300 \mu\text{g/mL}$), en consecuencia, las vacas de menor edad presentan la mayor cantidad de folículos.

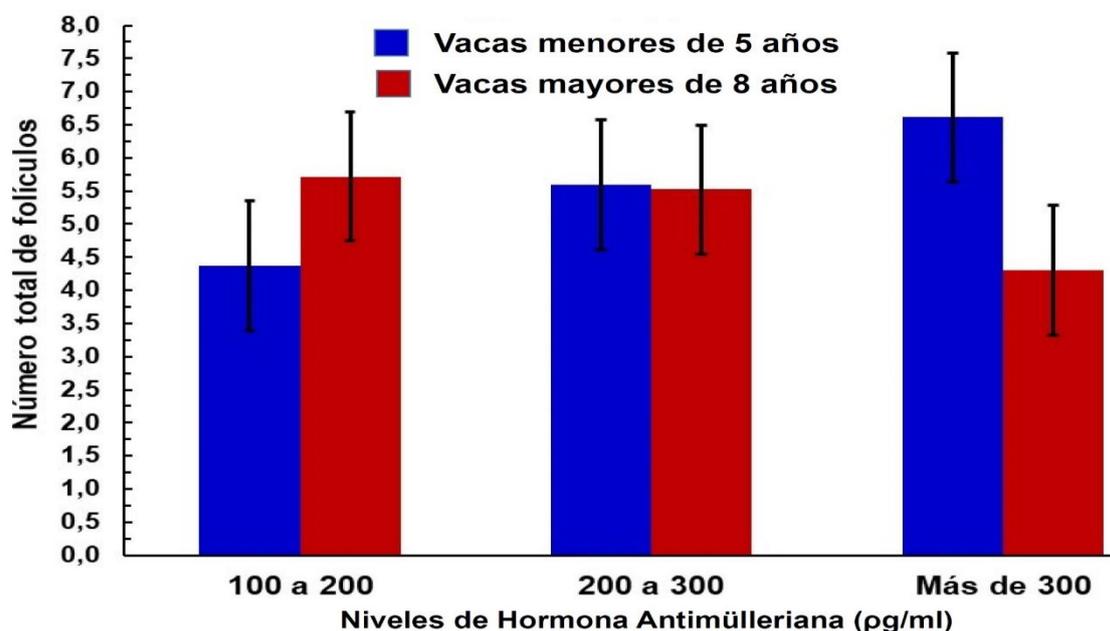


Gráfico 4.3. Desdoblamiento de la interacción edad de las vacas * niveles de la AMH de la variable número total de folículos (barras de error corresponden al nivel crítico de Tukey al 5%).

Los resultados de la presente investigación difieren a los reportados por Ribeiro *et al.* (2014), que en vacas de 2 y 3 partos mostraron concentraciones de AMH más altas que las de un solo parto. Observaron que vacas con baja concentración de AMH tenían menores tasas de preñez después del primer

servicio y una mayor incidencia de pérdida de la gestación entre los días 30 y 65, así como también menor tasa de gestación en el siguiente parto.

Por otra parte, el presente trabajo muestra similitud respecto a los resultados presentados en el gráfico 4.3 con Gobikrushanth *et al.* (2018), quienes en un estudio realizado en vacas Holstein, reportan las concentraciones de AMH se ven aumentadas cuando existe un mayor reclutamiento y desarrollo folicular ovárico hasta los cinco años de edad. Lo que permite inferir que en relación a los niveles óptimos de AMH, el mayor número de folículos está asociado al mayor rango de AMH y a las vaquillas de edades comprendidas entre 25-30 meses de edad.

La localización de la AMH en las células de la granulosa, comenzando en la etapa del folículo secundario, sugiere que la AMH de los folículos en crecimiento frena la activación del folículo y atenúa la tasa de crecimiento folicular en el ganado *in vivo*. Esto sustenta con la respuesta alcanzada en el presente trabajo en donde se contabilizó un mayor número de folículos en vacos jóvenes de diámetro de entre 2 a 4 mm con rangos de AMH plasmáticos superior a 300pg/ml.

Los resultados de la interacción para el número de folículos indican que el mayor número estuvo asociado a los mayores rangos hormonales para ambas edades de vacas y así como mayor número de folículos en las vacas menores de 5 años en el rango más elevado (>300 pg/mL) de la AMH.

NÚMERO DE FOLICULOS DE 2-4 MM

En la gráfico 4.4 se presenta de forma gráfica la interacción significativa para la variable número de folículos de 2-4 mm (Cuadros 4.3 y 4.4). De manera similar a los observado para el número total de folículos, para las vacas menores de 5 años los niveles hormonales comprendidos entre 100-200 pg/mL difieren de los observados para 200-300 y >300 pg/mL, respectivamente, mientras que estos últimos son similares entre sí.

Por otro lado, en las vacas mayores de 8 años no se detectan diferencias entre los tres niveles de la AMH. Dentro de cada uno de los rangos hormonales se puede constatar que apenas en el rango >300 pg/mL presenta diferencias para

el número de folículos entre 2-4 mm, donde se verifica que la mayor actividad está presente en las vacas menores de 5 años.

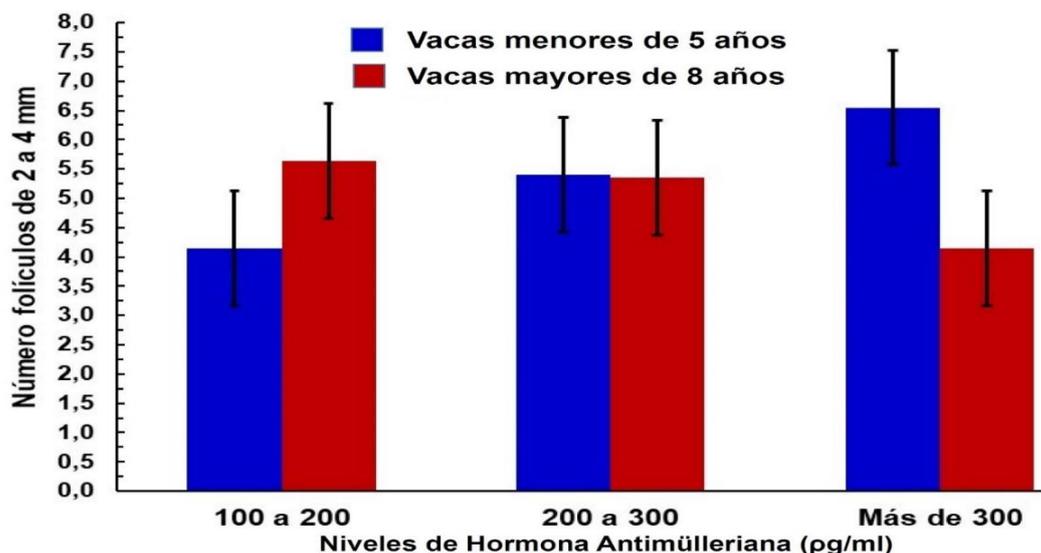


Gráfico 4.3. Desdoblamiento de la interacción edad de las vacas*niveles de la AMH de la variable número de folículos comprendidos entre 2 y 4 mm (barras de error corresponden al nivel crítico de Tukey al 5%).

Al igual que el número de folículos totales, con el cual guarda una alta correlación, la tendencia es a obtener la mayor cantidad de folículos en los dos rangos más elevados de la hormona y principalmente en el mayor rango donde para ambas variables hay diferencias importantes entre el número de folículos que favorece a las vacas menores de 5 años, esos resultados se consolidan con lo señalado por Melado (2014) que indica que a medida que aumenta la edad de las hembras, disminuye la cantidad de folículos con capacidad de desarrollo y maduración, y en consecuencia la calidad de los ovocitos particularmente en esta investigación se muestra ocurrir en el rango >300 pg/mL.

NÚMERO DE FOLICULOS COMPRENDIDOS ENTRE 4,1-7 Y > 7MM

Para ambas variables no se detectaron diferencias significativas por la prueba de F en el análisis de varianza (Cuadros 4.3 y 4.4), debido a la limitada cantidad de folículos de dichos tamaños, evidenciando que los folículos de mayor tamaño escapan del control inhibitorio de la AMH.

Tal respuesta estaría vinculada a lo reportado por Rojas *et al.* (2014) con relación a la reducción del número final de folículos preovulatorio que conducen a la mono ovulación. Koizumi y Kadokawa (2017) no detectaron ninguna relación entre la

concentración plasmática de AMH y el número de folículos ≥ 5 mm, los tamaños de los folículos más grandes en los ovarios, el tamaño del cuerpo lúteo o la concentración plasmática de progesterona, lo cual se atribuyó a que casi toda la AMH plasmática se originó a partir de células de la granulosa de los folículos antrales pequeños y preantrales y no de los folículos antrales y el cuerpo lúteo más grandes (Bhide *et al.* 2016).

Rico *et al.* (2009) encontraron que tanto las concentraciones de AMH en plasma como en líquido folicular fueron mayores en vacas con más folículos antrales de tamaño pequeño y mediano (3-7 mm de diámetro) que en aquellas con folículos grandes (> 7 mm de diámetro), por lo tanto, se puede inferir que los mayores niveles de AMH fue producido por un número relativamente mayor de folículos antrales pequeños y medianos que estaban activos en el momento de la aparición de la onda folicular.

CUERPO LÚTEO

Los resultados obtenidos sobre el tamaño del cuerpo lúteo nuevamente se ratifican en la interacción significativa edad de las vacas y rangos de la AMH, no hubo diferencias entre las vacas menores de 5 años para los tres rangos hormonales; sin embargo, para las vacas mayores de 8 años los menores rangos de AMH fueron similares entre si y presentaron mayor tamaño del cuerpo lúteo mientras que el rango >300 $\mu\text{g/mL}$ difiere del comprendido entre 200-300 $\mu\text{g/mL}$ y se observó el menor tamaño del cuerpo lúteo.

Esta variable en relación al número total de folículos y numero de folículos entre 2-4mm es totalmente opuesto, esto porque primero son en las vacas mayores de 8 años donde se observa los mayores tamaños de cuerpo lúteo y segundo porque eso ocurre en los rangos más bajos de la hormona. Esta discrepancia parece indicar que mayores tamaños del cuerpo lúteo no implican mayor cantidad de folículos, por tanto, esta variable no vincula una actividad con la otra.

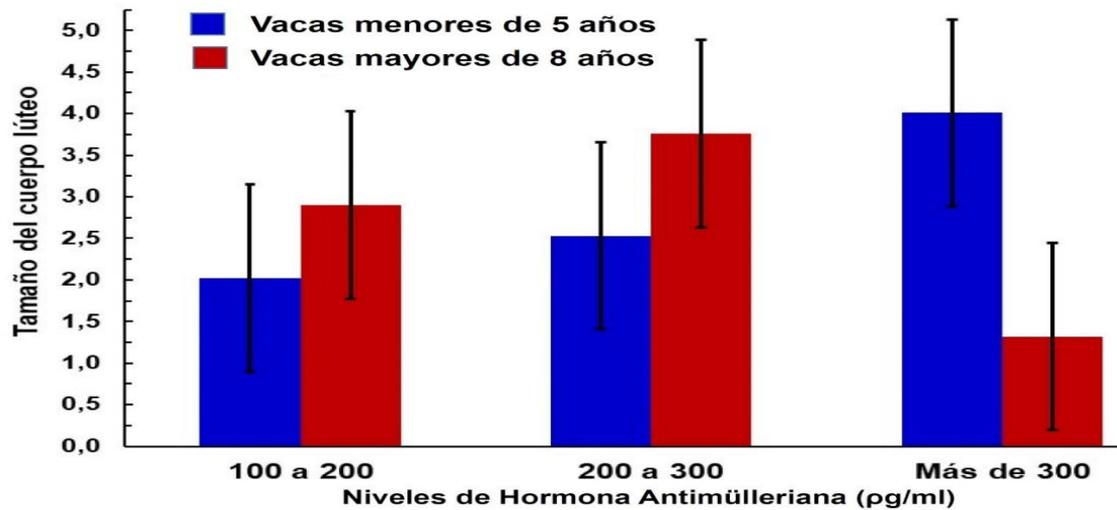


Gráfico 4.5. Desdoblamiento de la interacción edad de las vacas*niveles de la AMH de la variable tamaño del cuerpo lúteo (barras de error corresponden al nivel crítico de Tukey al 5%).

Por último, a medida que la edad de los animales avanza, la cantidad de ovocitos disminuye rápidamente durante este envejecimiento y además la tasa de concepción promedio decae después de procesos reproductivos), en animales *Bos taurus*, en las cuales se ha evidenciado que va desde un máximo de 56,0% a los 15-16 meses de edad a 42,0% a los 26-27 meses de edad (Kuhn *et al.* 2006) mientras que en los en animales *Bos indicus* comentar los datss numerososy porcentuales que secorresponde con los resultados de la presente tesis. Lo mencionado con aterioridad en este acápite, indicaría que los niveles de AMH en las vacas y vaquillas están íntimamente en dependencia de la edad de los animales.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Existe correlación positiva entre la edad de los animales jóvenes y los niveles de AMH, pero no en vacas mayores de 8 años.

Existe un efecto positivo entre el número de folículos disponibles o reclutados en los primeros días del ciclo estral con niveles altos AMH en vacas Brahman menores a 5 años de edad.

Independientemente de la edad, se encontró una relación directa entre el número total de folículos y el número de folículos de 2 a 4 mm, lo cual indica que éste es el diámetro predominante en las vacas Brahman en estudio, sin tener en cuenta los rangos los niveles de la hormona.

5.1. RECOMENDACIONES

Las concentraciones de AMH se deben considerar como un parámetro a tener en cuenta en el momento de comprar genética de elite para procesos de biotecnologías reproductivas tales como superovulación de vacas para producción de embriones *in vivo* o en los procesos de producción de embriones *in vitro* a través de la punción folicular.

Extraer genética de vacas Brahman jóvenes para abaratar costos en la producción de embriones.

La AMH puede ser usado como un asistente potencial para mejorar los parámetros reproductivos en vacas Brahman.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, H. 2001. Prostaglandins, related factors, and cytokines. Section 4. Chap 21st pp 420-432 En: Adams, H. R. Veterinary pharmacology and therapeutics. 8th Edition. Iowa State University Press/AMES.
- Ake, J., Alfaro, M., Aguayo, A., y Holy, L.1998. Concentración plasmática de progesterona y producción embrionaria, en vacas superovuladas bajo condiciones tropicales,(Tesis de pregrado), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán.
- Almeida J., Ball A., Conley J., Place J., Liu M., Scholtz L., Mathewson L., Stanley S. y Moeller B. 2011. Biological and clinical significance of anti-Müllerian hormone determination in blood serum of the mare. Theriogenology. 76:1393-1403.
- Anduaga, I., Lambrechts, P., Genesio, K., Grunwaldt, M., Rautenberg, G., Vautier, R., Avendaño, C. 2015. (PDF) Efecto de los valores de AMH y el número de ovocitos en vacas brangus. Recuperado de <http://www.zyvot.com/wp-content/uploads/2015/08/efectos.pdf>
- Arrau, J. 1984. Cinética folicular ovárica y su control. En: Curso internacional relaciones materno fetales y nuevas tecnologías en transferencia de embriones. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.133 – 148.
- Ascanio, M. 2009. Regulación neuroendocrina del ciclo estral en la hembra bovina. Colombia, SAN. Revista Respuestas - Universidad Francisco de Paula Santander 9 (1):11-12.
- Asprón, M. 2004. Curso de Actualización - Manejo Reproductivo del Ganado Bovino. En: Aviso. New York. p 25-26.
- Atuesta, J. y Gonella, A. 2011. Control hormonal del ciclo estral en bovinos y ovinos. Colombia, BUC. Revista Spei Domus.7 (14):16-17.
- Bearden, J., Fuquay, W. 1982. Reproducción animal aplicada. Trad. H.S. López. Cuauhtémoc, México. El Manual Moderno, S.A de C.V. 3: 358.
- Bényei, B., A. Gáspárdy, S.C. Seh. 2003. Effect of the El Niño phenom on the ovarian responsive and embryo production of donor cows. Acta Vet Hung. 51(2):209-218.
- Bhide P, Homburg R. 2016. Anti-Müllerian hormone and polycystic ovary syndrome. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol; S1521–6934: 30002–30005.
- Bhide, P; Shah, A; Gudi, A. Homburg R. 2012. The role of anti-Müllerian hormone as a predictor of ovarian function Obstet Gynecol, 14: 161-166.

- Bittán M. 2013. Apuntes sobre la ganadería y su importancia en Venezuela. 26 de Abril del 2019, de América Economía Sitio web: <https://www.americaeconomia.com/analisis-opinion/apuntes-sobre-ganaderia-y-su-importancia-en-venezuela>.
- Booth, N. y McDonald, L. 1988. Farmacología y Terapéutica Veterinaria. 5a. ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Borges, A.M., C.A.A. Torres, J.R.M. Ruas, V.R. Jr Rocha, G.R. Carvalho. 2001. Dinámica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 53:595-604.
- Burger H y Igarashi, M. 1988.: definition and nomenclature, including related substances». The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 66 (4): 885-6.
- Callejas, S.1995. Fisiología del ciclo estral bovino. Jornadas de biotecnología de la reproducción en hembras de interés zootécnico, UNLZ y SYNTEX S.A.,
- Camelo, I. y Zorro, Y. 2008. Dinamica folicular en hembras bovinas cebuinas sincronizadas mediante dispositivo intravaginal nuevo y usado.(PDF). Recuperado de <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/5948/T14.07%20C144d.pdf?sequence=1>
- Carmichael M., Humbert R., Dixen J., Palmisano G., Greenleaf W y Davidson, J. 1987. "Plasma oxytocin increases in the human sexual response, J Clin
- Center, K., Dixon, D., Looney, C., y Rorie, R. 2018. Anti-mullerian hormone and follicle counts as predictors of superovulatory response and embryo production in beef cattle. Advances in Reproductive Sciences, 6(01), 22.
- De Caro R. y Sícaro L. 2008. Hormona Anti-Mülleriana de la Embriología a la Fertilidad. Saegre. :1-27.
- Del Río A., Nieto V., Sánchez M., Zamorano R., Torres J., Méndez M., Acosta B, S., Torres G. A. y Luna N. P. 2017. La hormona anti-mulleriana como un marcador endócrino asociado a la fertilidad postparto en Vacas Holstein. La Sociedad Académica, 49, 50-56.
- Del Valle, T. 2008. Dinámica folicular ovárica durante el ciclo estral en vacas doble propósito. (PDF). Recuperado de http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_44.pdf
- Di Rienzo J., F. Casanoves, M. Balzarini, L. González, M. Tablada y C. Robledo. 2016. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Díaz, U., Stangaferro, M., Rey, F., Gareis, N., Matiller, V., Salvetti, N., Barberis, F., Quercia, E., Ortega, H. 2013. Determinación de la AMH (AMH) en líquido folicular de bovinos con folículos persistentes inducidos y

- enfermedad quística ovárica espontánea. X Simposio Internacional de Reproducción Animal. Irac. :287.
- Erickson, G., Wang, C., Hsueh, A. J. 1976. FSH induction of functional LH receptors in granulosa cells cultured in a chemically defined medium. *Nature*. 279; 336-338
- Espinoza, J., Ortega, R., Palacios, A., Valencia, J y Aréchiga, C. 2007. Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interciencia*, 32(2), 93-99.
- Evkuran D, Alcigir E, Mert P, Vural S., Esra H., Rifat R. y Kuplulu S. 2013. Granulosa Theca Cell Tumor in An Arabian Mare: Are Immunohistochemically Loss of GDF-9 and BMP-6 Proteins Associated with High GATA-4, Inhibin-a, AMH Expressions. *Journal Home Page*. 19:237-242.
- Fanchin, R., Schonäuer, L., Righini, C., Guibourdenche, J., Frydman, R., Taieb, J. 2003. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod*; 18:323-7.
- Fernández, Á. 2003. Dinámica folicular: funcionamiento y regulación (html). Recuperado a partir de: <http://www.produccion-animal.com.ar/>
- Fortune J. 1993. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility *Anim Reprod Sci* 33:111-125.
- Freeman M. 2006. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Neill JD (Ed.). *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. United States of America: Elsevier Academic Press. pp 2327- 2388.
- Gelbart W. (1989). The decapentaplegic gene. A TGF-beta homologue controlling pattern formation in *Drosophila*. *Development* 107:65- 74.
- Ginther O., Kot K, Kulic LJ, Wiltbank MC. 1997. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 48:5-87.
- Giulini, S., Tirelli, A., Bertucci, E., Marsella, T., Xella, S., Volpe, A. 2007. Anti-Müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod*; 22:766-771.
- Gobikrushanth, M., Purfield, D. C., Colazo, M. G., Butler, S. T., Wang, Z., y Ambrose, D. J. 2018. The relationship between serum anti-Müllerian hormone concentrations and fertility, and genome-wide associations for anti-Müllerian hormone in Holstein cows. *J. Dairy Sci*. 101:1-12.
- Godoy, H., Ulloa, A., Falcón, J., Marsai, E., Rivas, R., García, L. 2012. AMH como marcador de respuesta ovárica en fertilización in vitro. *Ginecol Obstet*

- Gutiérrez, J. 2008. Hormonas de la reproducción bovina. En: González S., C.; Madrid B., N., Soto B., E.(eds). Desarrollo Sostenible de la Ganadería Doble Propósito. Fundación GIRARZ. Ediciones Astro Data SA Maracaibo-Venezuela. Cap, 42, 515-530.
- Gutiérrez, J. C. (2008). Manual de ganadería doble propósito: Hormonas de la reproducción bovina. Enero 5, 2016, de Asociación venezolana de producción animal. Recuperado de:
- Henao, G. 2010. Algunos Factores Relacionados con la Dinámica Follicular en *Bos indicus*. Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín, 63(2).
- Hernández C.J. 2012. Fisiología clínica de la reproducción de bovinos lecheros. Desarrollo follicular. Delegación Coyoacán México D.F. pp. 20-24.
- Illera, M. 1994. Reproducción de los animales domésticos. Madrid: Aedos.
- Ireland J., Scheetz D., Jimenez-Krassel F., Themmen A.P.N., Ward F., Lonergan P., Smith G.W., Perez G.I., Evans A.C.O. y Ireland, J.J. 2008. Antral Follicle Count Reliably Predicts Numbers of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle. *Biology of Reproduction*. 79:1219-1225.
- Ireland, J., Scheetz, D., Jimenez, F., Themmen, A., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G., Perez, G., Evans, A. 2008. Antral Follicle Count Reliably Predicts Numbers of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle. *Biology of Reproduction*. 79:1219-1225.
- Ireland, J., Ward, F. Jimenez-Krassel, J., Ireland, G., Smith, P. Lonergan, A.C. Evans. 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod*. 22:1687–1695.
- Jimenez, F; Scheetz, D; Neuder, L; Ireland, J; Pursley, J; Smith, G. Tempelman, R; Ferris, T; Roudebush, W; Mossa, F; Lonergan, P; Evans, O. 2015. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. *Journal of Dairy Science*. 98:3036-3045.
- Jimenez-Krassel F., Scheetz D.M., Neuder L.M., Ireland J.L.H., Pursley J.R., Smith G.W., Tempelman R.J., Ferris T., Roudebush W.E., Mossa F., Lonergan P., Evans A.C.O. y Ireland J.J. 2015. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. *Journal of Dairy Science*. 98:3036-3045.
- Jimenez-Krassel, F., J. K. Folger, J. L. Ireland, G. W. Smith, X. Hou, J. S. Davis, P. Lonergan, A. C. Evans, and J. J. Ireland. 2009. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *Biol. Reprod*. 80:1272–1281.

- Kanehisa MI. 1984. Use of statistical criteria for screening potential homologies in nucleic acid sequences. *Nucleic Acids Res*; 12:203-13.
- Koizumi, M., y Kadokawa, H. 2017. Positive correlations of age and parity with plasma anti-Müllerian hormone concentrations in Japanese Black cows. *Journal of Reproduction and Development*, 63(2), 205-209.
- Kuhn, M. T., Hutchison, J. L., and Wiggans, G. R. 2006. Characterization of Holstein heifer fertility in the United States. *J. Dairy Sci.* 89(12), 4907–4920.
- Lee H., Macbeth H., Pagani J y Oxytocin. 2009. The great facilitator of life. *Prog Neurobiol*; 88:127-151.
- Llusiá, J. 1995. *El Ovario: Fisiología y Patología*. Ediciones Díaz de Santos.
- López, M. 2012. Conocimientos generales: Regulación neurológica y hormonal de la función reproductora. Fisiología de la pubertad y del climaterio. (PDF) Recuperado de http://www.chospab.es/area_medica/obstetriciaginecologia/docencia/seminarios/2012-2013/sesion20120620.pdf
- Macmillan, K. y Henderson, H. 1984. Analyses of the variation in the interval from an injection of prostaglandin Fea to estrus as a method of studying patterns of follicle development during diestrous in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 6:245-254. 66 66.
- Martínez, N. 2005. Fisiología Reproductiva de la Hembra. Colombia, BOG. *Revista de Medicina Veterinaria*. No 14. p 107-124.
- McCullagh GR. 1932. Dual endocrine activity of the testes. *Science*, 76 , pp. 19
- Melado, L. 2014. Dinámica de la AMH durante los tratamientos de fiv-icsi y su correlación con las tasas de gestación. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Mossa F, Carter F, Walsh SW, Kenny DA, Smith GW, Ireland JL, Hildebrandt TB, Lonergan P, Ireland JJ, Evans AC, 2013. Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. *Biol Reprod* 88, 92, 1-9.
- Mossa, F. 2014. La AMH como indicadora de la capacidad reproductiva en la vaca. (PDF). Recuperado de <https://www.reproduction.com/es/Trials-y-Articulos/2014.01.02-La-hormona-antimülleriana-como-indicadora-de-la-capacidad-reproductiva-en-la-vaca>
- Motta, P; Ramos, N; González, C; Castro, E. 2011. Dinámica folicular en la vida
- Nelson, M; Yates, W; Fleming, R. 2007. Serum antimüllerian hormone and FSH: prediction of live birth and extremes of response in stimulated 128 La

- Marca *et al.* cycles—implications for individualization of therapy. *Hum Reprod*; 22:2414–2421.
- Peña C y Correa, A. 2018. Respuesta superovulatoria asociada a los niveles de hormona antimülleriana en vacas donadoras. Trabajo de grado. Maestría en Ciencias en Sistemas de Producción Animal. Universidad Autónoma de Baja California. 65 p.
- Pepinsky RB, Sinclair LK, Chow EP, Mattaliano RJ, Manganaro TF, Donahoe PK *et al.* (1988). Proteolytic processing of Müllerian inhibiting substance produces a transforming growth factor-beta-like fragment. *J Biol Chem*; 263:18981-18986.
- Peters, R.; Martinez, T; Cook, J. 2004. A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11-14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 54, 1317-1326.
- Pfeiffer, K; Jurado, L; Larson, J. 2014. Determination of anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine celous cycle. *Domestic Animal Endocrinology*. 46:58-64.
- Philip, G. 2003. Factores correguladores del crecimiento y diferenciación folicular independiente de gonadotropinas. (En línea). Consultado, 8 de oct. 2017. Disponible en <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3397/articulos-otros-temas-archivo/factores-correguladores-del-crecimiento-y-diferenciacion-folicular-independiente-de-gonadotropinas.html>.
- Pizzi, R; Centeno, I; Fung, L; Pérez, Y; Toro, F; González, Y; Fernández, M. 2015. Niveles de AMH en pacientes con síndrome de ovario poliquístico. *Venezuela, CAR. Rev Obstet Ginecol Venez* vol.75 no.4. p 252
- Pursley J., Mee, M., y Wiltbank, M. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using pgf2 α and gnrh. *Theriogenology* 44:915-923
- Reeves, J. 1987. Endocrinology of reproduction. En: *Reproduction in Farm Animals* 5th. Hafez, E. (ed). Lea & Febiger. Philadelphia, USA.
- Rey, R; Bedecarrás, P; Brugo, O; Vincentiis, S; Calamera, P; Blanco, A; Grinson, R; Freire, A; Buffone, M. 2013. AMH (AMH) como herramienta diagnóstica en la mujer. *Revista Saegre*. :12-24.
- Ribeiro, E; Bisinotto, R; Lima, F; Greco, L; Morrison, A; Kumar, A; Thatcher, W; Santos, J. 2014. Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *American Dairy Science Association*. 97:6888-6900
- Ricárdez, M. 2015. Efectos de la AMH (AMH) en bovinos. (PDF). Recuperado de [//repositorio.uaaan.mx:8080/xmLui/bitstream/handle/123456789/7793/MATHUS%20RICARDEZ%20MARTINEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmLui/bitstream/handle/123456789/7793/MATHUS%20RICARDEZ%20MARTINEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- Rico, C., Fabre, S., Médigue, C., Clemente, N. D., Clément, F., Bontoux, M., Touzé, J.; Briant, E.; Rémy, B.; Beckers, J. F. y Monniaux D. 2009. Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biology of reproduction*, 80(1), 50-59.
- Schoenemann, H., Humphrey., Crowder, M. et al. 1985. Pituitary luteinizing hormone releasing receptors in ovariectomized cows after challenge with ovarian steroids. *Biology of Reproduction*, 32: 574-583.
- Sighinolfi, G; Radi, D. 2010. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Human Reproduction Up*; Vol.16-2:113-130.
- Silva, F. y Azevedo C. 2016. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *Afr. J. Agric. Res.* 11(39): 3733-3740.
- Singh, J., Domínguez, M., Jaiswal, R., y Adams, G. P. 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology*, 62(1-2), 227-243.
- Souza A.H., Carvalho P.D., Rosner A.E., Vieira L.M., Hackbart K.S., Bender R.W., Dresch A.R., Verstegen J.P., Shaver R.D. y Wiltbank M.C. 2015. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 98:169-178.
- Sowers, M; Eyvazzadeh, A; McConnell, D; Yosef, M; Jannausch, M; Zhang, D; Harlow, S; Randolph, J. 2008. Anti-müllerian hormone and inhibin B in the definition of ovarian aging and the menopause transition. *J Clin*
- Unger, S. y Beraja, H. 2010. AMH. Reserva ovárica y reserva testicular. *Reproducción*, 25, 137-153
- Vales, C. 2016. Relación entre las concentraciones de AMH y el número de embriones transferibles en hembras bovinas. (PDF). Recuperado de <http://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/752/VALES%20CARLA%20ESTEFANIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Velázquez, J. y Mendieta, E. 2015. Factores que regulan el desarrollo folicular I: folículos preantrales. *Encuentros en la Biología*, (99), 1.
- Wachs, S; Coffler, S; Malcom, J; Chang, J. 2007. Serum anti-müllerian hormone concentrations are not altered by acute administration of follicle stimulating hormone in polycystic ovary syndrome and normal women. *J Clin Endocrinol Metab*; 92:1871–1874.
- Williams, G., Gasai, O., Guzman, G., y Stanko, R. 1996. Mechanisms regulating suckling mediated anovulation in the cow. *Animal Reproduction Science*, 42:289-297.

ANEXOS

Anexo 1. Resultados del análisis de varianza para las variables bajo estudio.
ANOVA Número de folículos totales (datos no transformados)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	P-valor
Edad	1	74.81	74.809	0.65	0,4338
Rango AMH	2	123.83	61.913	0.54	0,5958
Edad*Rango_AMH	2	967.22	483.611	4.20	0,0373
Nivel AMH/<5 años	1	742,339	742,339	6,444	
Nivel AMH/>8 años	1	348,708	348,708	3,027	
Error	14	1612,67	115,190		

ANOVA Número de folículos de 2 a 4 mm (datos no transformados)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	P-valor
Edad	1	75.82	75.823	0,65	0,4351
Rango_AMH	2	110.08	55.038	0,47	0,6353
Edad*Rango_AMH	2	1037.81	518.907	5,42	0,0325
Nivel AMH/<5 años	1	797,104	797,104	6,788	
Nivel AMH/>8 años	1	348,708	348,708	3,027	
Error	14	1643,92	117,423		

ANOVA Número de folículos de 4 a 7 mm (datos no transformados)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	P-valor
Edad	1	0,1399	0,13989	0,18	0,6790
Rango_AMH	2	0,5583	0,27913	0,36	0,7064
Edad*Rango_AMH	2	0,0723	0,03614	0,05	0,9551
Error	14	10,9667	0,78333		

ANAVA Número de folículos mayores a 7 mm (datos no transformados)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	P-valor
Edad	1	0,03948	0,03948	0,17	0,6848
Rango_AMH	2	0,34875	0,17438	0,76	0,4865
Edad*Rango_AMH	2	1.15872	0,57936	2,52	0,1161
Error	14	3.21667	0,22976		

ANOVA Tamaño del cuerpo lúteo (datos no transformados)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	P-valor
Edad	1	1,692	1,692	0,04	0,8516
Rango_AMH	2	73,577	36,789	0,79	0,4733
Edad*Rango_AMH	2	404,890	202,445	4,34	0,0340
Nivel AMH/<5 años	1	196,619	196,619	4,220	
Nivel AMH/>8 años	1	281,848	281,848	6,049	
Error	14	652,323	46,595		

ANEXO 2. Selección de vacas completamente al azar

ANEXO 3. Toma de muestras de sangre por punción yugular



ANEXO 4. Muestras de sangre extraídas por punción yugular



Anexo 5. Revisión de las vacas mediante ecografía



Anexo 6. Ecografía transrectal

