



**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:

**NIVELES SÉRICOS DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA EN
DONADORAS BRAHMAN Y SU EFECTO EN LA RESPUESTA
SUPEROVULATORIA Y LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES**

AUTORES:

**WILIAN ALEJANDRO INTRIAGO LOOR
TELMO ALEXANDER ZAMBRANO MENDOZA**

TUTOR:

DR. JORGE IGNACIO MACÍAS ANDRADE, Mg.

CALCETA, MAYO 2019

DERECHOS DE AUTORÍA

Wilian Alejandro Intriago Loor y Telmo Alexander Zambrano Mendoza, 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.

.....
TELMO A. ZAMBRANO MENDOZA
C.I. 131082055-8

.....
WILIAN A. INTRIAGO LOOR
C.I. 131570414-6

CERTIFICACIÓN DE TUTOR

Jorge Ignacio Macías Andrade, certifica haber tutelado el proyecto NIVELES SÉRICOS DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA EN DONADORAS BRAHMAN Y SU EFECTO EN LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA Y LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES, que ha sido desarrollada por Wilian Alejandro Intriago Loor y Telmo Alexander Zambrano Mendoza, previa la obtención del título de Médico Veterinario, de acuerdo con el **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria De Manabí Manuel Félix López.

.....
DR. JORGE I. MACÍAS ANDRADE, Mg.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaran que han **APROBADO** el trabajo de titulación NIVELES SÉRICOS DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA EN DONADORAS BRAHMAN Y SU EFECTO EN LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES, que ha sido propuesta, desarrollada y sustentada por Telmo Alexander Zambrano Mendoza y Wilian Alejandro Intriago Loor, 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 M. LÓPEZ
RAUSCHEMBERG, Mg.Sc.
MIEMBRO

.....
M.V. ANDRES J. VERA
CEDEÑO, Mg.Sc.
MIEMBRO

.....
DR. DERLYS H. MENDIETA CHICA Mg.Sc.
PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí por haberme dado la oportunidad de seguir con mis estudios superiores.

A Dios por ser mi guía y acompañarme en el transcurso de mi vida, brindándome paciencia y sabiduría para culminar con éxitos mis metas propuestas.

A mis padres, Lesther y Dolores por ser los principales promotores de este sueño por confiar y creer en mí, gracias por sus consejos, valores y principios que me han inculcado.

A mi tutor al Dr. Ignacio Macías Andrade quien con su experiencia y conocimiento me oriento en la investigación.

A todos los docentes de la carrera de Medicina Veterinaria por haber compartido sus conocimientos a lo largo de estos años de preparación como persona y profesional.

.....
WILIAN A. INTRIAGO LOOR

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día.

A mis padres, Telmo y Verónica por haberme dado la vida, por ser mi mano derecha, les agradezco por su ayuda desinteresada, por siempre inculcarme buenos valores que nada es imposible.

A mi tía Ñeca, por ser la persona que más me ha apoyado desinteresadamente a lo largo de mi vida sin importar cuantas decisiones erróneas haya tomado hasta ahora.

A mis pequeños hijos Isabela y Novak que me motivan e inspiran cada día y a mi esposa que con su apoyo emocional me ha permitido no desmayar en los momentos más difíciles que he afrontado.

A mi tutor, el Dr. Ignacio Macías Andrade por brindarnos su apoyo incondicional en el transcurso de esta investigación.

A todos mis docentes ya que a través de su dedicación, confianza y apoyo me enseñaron a valorar los estudios y a superarme cada día más.

.....
TELMO A. ZAMBRANO MENDOZA

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico a Dios por haberme dado salud, por ser manantial de vida y darme lo necesario para seguir adelante día a día para lograr mis objetivos, además de sus infinita bondad y amor, a mi familia que gracias a su apoyo en todo momento pude concluir mi carrera.

A mis padres y hermanos por su apoyo y confianza en todo lo necesario para cumplir mis objetivos como persona y estudiante.

A mi padre por brindarme los recursos necesarios y estar a mi lado apoyándome y aconsejándome siempre, por ser un ejemplo de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me lo ha inculcado siempre.

A mi madre por hacer de mí una mejor persona a través de sus consejos enseñanzas y amor, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien.

A mis hermanos por estar siempre presentes, acompañándome.

A mis docentes por su gran apoyo y motivación para la realización de este trabajo, por haberme transmitido los conocimientos obtenidos y haberme llevado paso a paso en el aprendizaje, y

A mi compañero de Tesis Telmo Zambrano por estar siempre conmigo, por motivarme a seguir luchando para alcanzar mis metas propuestas.

A todos en general por darme el tiempo para realizarme profesionalmente.

.....
WILIAN A. INTRIAGO LOOR

DEDICATORIA

De manera muy especial a mi padre que me acompaña en todo mí caminar y me da fuerzas para seguir adelante. A mi madre por darme la estabilidad emocional, sentimental; para poder llegar hasta este logro, que definitivamente no hubiese podido hacer realidad sin ella, GRACIAS.

A toda mi familia en general, a mis hijos y esposa quienes son y serán el motivo para seguir luchando para alcanzar mis metas propuestas.

A mi compañero de Tesis mi estimado amigo Wilian por ser un amigo incondicional, y estar siempre conmigo en los buenos, malos, felices y tristes momentos, a mis amigos pasados y presentes; pasados por ayudarme a crecer y madurar como persona y presentes por estar apoyándome en todas las circunstancias posibles, también son parte de esta alegría.

.....
TELMO A. ZAMBRANO MENDOZA

CONTENIDO GENERAL

CARÁTULA.....	i
DERECHOS DE AUTORÍA.....	ii
CERTIFICACIÓN DE TUTOR.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	viii
CONTENIDO GENERAL.....	ix
CONTENIDO DE CUADROS.....	xi
CONTENIDO DE GRÁFICOS	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	3
1.3. OBJETIVOS.....	5
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	5
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
1.4. HIPÓTESIS	6
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. OVULACIÓN	7
2.2. DINÁMICA FOLICULAR	7
2.4.1. CRECIMIENTO FOLICULAR	9
2.3. HORMONA ANTIMÜLLERIANA.....	10
2.3.1. ESTUDIOS DE AMH EN OTRAS ESPECIES.....	12
2.4. PROTOCOLOS MÚLTIPLE OVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (MOET)	14
2.6.1. SELECCIÓN DE VACAS DONANTES.....	15
2.7.1. CLASIFICACIÓN DE EMBRIONES POR ESTADIO Y CALIDAD.....	16
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO.....	19
3.1. UBICACIÓN	19
3.2. CONDICIONES CLIMÁTICAS.....	19
3.3. DURACIÓN DEL TRABAJO	19

3.4. FACTOR (ES) EN ESTUDIO.....	19
3.5. UNIDAD EXPERIMENTAL.....	19
3.6. VARIABLES EN ESTUDIO	19
3.6.1. VARIABLE INDEPENDIENTE	19
3.6.2. VARIABLES DEPENDIENTES	19
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
3.8. PROCEDIMIENTO.....	20
3.9. OBTENCIÓN DE LAS VARIABLES.....	23
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE LAS VARIABLES	25
4.2. INFLUENCIA DE LOS RANGOS DE AMH	27
4.3. ANALISIS DE REGRESIÓN	32
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	36
ANEXOS	42

CONTENIDO DE CUADROS

Cuadro 4. 1. Coeficientes de correlación de Pearson para las variables total de folículos presente en el recuento folicular, total de estructuras ováricas, total de embriones, cuerpos lúteos, y ovocitos infertilizados.....	26
Cuadro 4.2. Total del número de folículos presentes en el recuento folicular.....	27
Cuadro 4.3. Total de cuerpos lúteos.....	28
Cuadro 4.4. Total de folículos anovulatorios.....	29
Cuadro 4.5. Estructuras ováricas.....	30
Cuadro 4.6. Total embriones entre vacas y vaquillas.....	31

CONTENIDO DE GRÁFICOS

Gráfico 4. 1. Curva del número total de folículos en función de los niveles de AMH. RF en eje de las Y en función de AMH en el eje X.....	32
Gráfico 4. 2 Curva del total de cuerpos lúteos en función de los niveles de AMH. CL en eje de las Y en función de AMH en el eje X.....	33

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue valorar el efecto de los niveles de AMH sobre la respuesta superovulatoria y producción de embriones *in vivo*. Se usaron 10 donadoras Brahman sometidas a un protocolo de superovulación tradicional con 1 o 0,5 g de progesterona (vacas y vaquillas respectivamente), 2,5 mg de benzoato de estradiol y dosis decreciente de FSH (350 UI vacas y 250 UI vaquillas). Todos los datos fueron analizados con el software estadístico Statistix 8.0 donde se efectuaron correlaciones de Pearson y pruebas de T-Student (0,05%). Los niveles de AMH fueron divididos en rangos de 100 a 255 y 256 a 700 picogramos/mililitro (pg/mL). No existió correlación entre los niveles de AMH y el total de embriones transferibles ($P=0.70$). Se encontró correlación entre los niveles de AMH y el total de folículos presentes en el recuento folicular en el Día 0 ($P=0.06$). Existieron diferencias significativas ($P=0,0031$) en la cantidad de folículos entre las vacas con niveles de AMH alto (256 a 700 pg/mL) con respecto a las de nivel bajo (100 a 255 pg/mL). No se encontraron diferencias significativas entre los rangos de AMH y el total de cuerpos lúteos ($P=0.60$). Así mismo al comparar el total de embriones en vacas y vaquillas no se encontraron diferencias significativas ($P=0.60$). En conclusión, los niveles de AMH se correlacionan positivamente con la población folicular previo al inicio de los protocolos de superovulación. Los resultados mostraron que a mayor nivel de AMH existe una mayor población folicular en donadoras Brahman.

PALABRAS CLAVE

In vivo, folículos, cuerpos lúteos, ovocitos infertilizados.

ABSTRACT

The objective of this research was to assess the effect of AMH levels on the superovulatory response and embryo production *in vivo*. Ten Brahman donors subjected to a traditional superovulation protocol with 1 or 0.5 g of progesterone (cows and heifers respectively), 2.5 mg of estradiol benzoate and decreasing dose of FSH (350 IU cows and 250 IU heifers) were used. All the data were analyzed with statistical software Statistix 8.0 where Pearson correlations and T - Student tests (0.05%) were performed. AMH levels were divided into ranges from 100 to 255 and 256 to 700 picograms/milliliter (pg/mL). There was no correlation between AMH levels and total transferable embryos (P=0.70). A correlation was found between the levels of AMH and the total number of follicles present in the follicular count on Day 0 (P=0.06). There were significant differences (P=0.0031) in the number of follicles between cows with high AMH levels (256 to 700 pg/mL) with respect to those of low level (100 to 255 pg/mL). No significant differences were found between the ranges of AMH and the total of corpora lutea (P=0.60). Likewise, when comparing the total embryos in cows and heifers, no significant differences were found (P=0.60). In conclusion, the levels of AMH correlate positively with the follicular population prior to the start of the superovulation protocols. The results showed that at a higher level of AMH there is a greater follicular population in Brahman donors.

KEYWORDS

In vivo, follicles, corpora lutea, infertilized oocytes.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En los últimos años las biotecnologías han progresado considerablemente, sobre todo en el área de la reproducción y la genética molecular. Entre las tecnologías reproductivas, la inseminación artificial, la superovulación y el trasplante embrionario han tenido un impacto notable en los programas de mejoramiento del ganado bovino (Bó y Mapletoft, 2003).

En la actualidad las explotaciones ganaderas se han enfocado en un objetivo principal; ser eficientes tanto productiva como reproductivamente, esta íntima relación asegura una alta rentabilidad y eficiencia productiva. Sin embargo, independientemente de los sistemas de manejo y producción, existen problemas en común que no permiten esta eficiencia (Hernández, 2012).

Uno de los principales inconvenientes es la disminución de la fertilidad en las ganaderías, lo cual muchas veces es asociado a una mala nutrición y al estrés ambiental en el que se desarrollan las actuales explotaciones (Ortiz *et al.*, 2005).

En la ganadería bovina la meta a alcanzar, es obtener la máxima eficiencia reproductiva, utilizando diferentes métodos para lograr el éxito en parámetros reproductivos, y aunque existen muchas técnicas y protocolos para el éxito de la eficiencia reproductiva, la innovación y aplicación de nuevas técnicas está tomando un papel determinante en la mayoría de explotaciones (Monniaux *et al.*, 2010).

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 (Mossa *et al.*, 2013).

La hormona antimülleriana (AMH), pertenece al factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) un miembro de la súper familia de factores de crecimiento y diferenciación celular; se dio a conocer en medicina humana, por su relación positiva en la fertilidad de las mujeres, así se despertó el ímpetu de

llevar a cabo estudios en la especie bovina para comprobar su similitud (Ricardez, 2015).

Larson (2014), comprobó que la producción de AMH está dado por las células de Sertoli en bovinos machos y en hembras bovinas por las células de la granulosa, por su amplia implicación que tiene sobre estas gónadas promete ser uno de los marcadores más útiles si no el más útil sobre la fertilidad de los bovinos y de otras especies, ya que se ha demostrado en diferentes estudios que esta glicoproteína carece muy poco de variaciones en lo que va del ciclo en comparación con las demás hormonas implicadas.

Debido a que la AMH se correlaciona con el tamaño de la reserva ovárica, puede usarse para predecir la fertilidad, la longevidad reproductiva y la respuesta a tratamientos antirretrovirales (Mossa e Ireland, 2018).

Se ha determinado que los niveles circulantes de AMH se encuentran asociados con la población folicular antral (AFP) y, de ese modo, se ha identificado esta hormona como un importante marcador de la respuesta endocrina a la superovulación y la producción de embriones *in vitro* en bovinos. (Baruselli *et al.*, 2015).

Anduaga *et al.* (2015) han descrito que la AMH podría ser utilizada como herramienta diagnóstica para estimar el potencial reproductivo y dar indicios sobre el estado de fertilidad de las vacas ya que su valor correlaciona positivamente con el número de ovocitos obtenidos en una aspiración folicular. De acuerdo a los antecedentes mencionados se plantea la siguiente interrogante:

¿Los niveles altos de AMH influirán positivamente sobre la respuesta superovulatoria y la producción de embriones en donadoras Brahman sometidas a protocolo de superovulación?

1.2. JUSTIFICACIÓN

En investigaciones realizadas por Baruselli *et al.* (2015), se analiza información reciente sobre la AFP y su asociación con la AMH, y la posibilidad de utilizar la AMH como marcador en las tecnologías reproductivas y en última instancia para mejorar la fertilidad del ganado bovino.

Como argumenta Souza *et al.* (2015), que el descubrimiento y comportamiento de la AMH puede ser alternativa en la reproducción bovina, debido a su similitud de acción en la especie estudiada (humano) y determinar aquellos individuos con mayor prolificidad. Por esta razón se han motivado estudios en el campo de la medicina veterinaria sobre el uso de la AMH como marcador de la fertilidad.

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. La raza y estado nutricional del animal se han descrito como un factor relacionado con la concentración de AMH, en este trabajo se utilizaron donadoras de raza Brahman (Mossa *et al.* , 2013).

Un estudio elaborado por Ribeiro *et al.* (2013) en vacas de leche 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 utilizar la AMH como indicador en explotaciones comerciales durante cualquier momento del ciclo productivo.

Ribeiro *et al.* (2014); Jimenez-Krassel *et al.* (2015), en reportes recientes observaron una asociación positiva entre la AMH y la fertilidad en vacas lecheras. Por ejemplo, en un estudio a gran escala realizado en Florida, Estados Unidos, informó que las vacas con bajos niveles plasmáticos de AMH tuvieron tasas de preñez más bajas al primer servicio y una mejor incidencia de pérdidas de preñez entre los días 30 y 65 de la gestación.

El presente trabajo de investigación contribuye en las biotecnologías reproductivas en el ganado bovino, en la actualidad existen pocos datos que afirmen el uso de la hormona AMH como marcador de un buen trabajo reproductivo, para Baruselli *et al.* (2015) el valor de utilizar la medición de niveles

plasmáticos de AMH para predecir la fertilidad en el campo sigue siendo controvertido, serán necesarios más estudios con un gran número de animales para sacar conclusiones definitivas.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Valorar el efecto de los niveles séricos de AMH sobre la respuesta superovulatoria y la producción de embriones *in vivo* en donadoras Brahman sometidas a protocolo de superovulación.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el efecto de los niveles séricos de AMH sobre el número de folículos presentes en el recuento folicular.

Valorar el efecto de los niveles séricos de AMH sobre el número de cuerpos lúteos.

1.4. HIPÓTESIS

Los niveles altos de AMH (256 a 700 $\mu\text{g/mL}$) en donadoras Brahman se correlacionan positivamente sobre la respuesta superovulatoria y la producción de embriones *in vivo*.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. OVULACIÓN

La ovulación es la ruptura de la pared del folículo y expulsión del ovocito rodeado por las células de la corona radiada. El folículo se colapsa y queda ocupado por células sanguíneas procedentes de la ruptura de pequeños vasos. Las células de la granulosa y las de la teca interna proliferan y llegan a ocupar el lugar del coágulo. Estas células son capaces de segregar progesterona, hormona que protegerá al ovocito y actuará sobre la mucosa uterina, preparándola para la implantación en el caso de que exista fecundación, se denomina entonces cuerpo lúteo (Climent *et al.*, 2012).

La ovulación tiene lugar unas 30 horas después del inicio del estro, es decir: después del final del estro comportamental. No obstante, varios factores pueden afectar al momento de la ovulación en relación con el pico de estradiol (signos máximos del estro). Una función lútea en peligro debido a deficiencias metabólicas y a una tasa metabólica excesiva, o los efectos de una temperatura ambiental alta (estrés térmico), puede dar lugar a un retraso en la ovulación. Esto puede dar como resultado un descenso considerable de la fertilidad debido a una temporización incorrecta de la IA (Diskin *et al.*, 2002).

Las células del trofoblasto producen una hormona, la luteotropina, capaz de mantener el cuerpo lúteo en el caso de que haya ocurrido la fecundación. Si no ha sido así, el cuerpo lúteo es transitorio y al cabo de unos días degenera y se convierte en una cicatriz fibrosa blanquecina, el corpus albicans (Climent *et al.*, 2012).

2.2. DINÁMICA FOLICULAR

La dinámica folicular puede definirse como el proceso continuo de crecimiento y regresión de folículos antrales que conlleva al desarrollo del folículo preovulatorio (Lucy *et al.*, 1992). Por su parte Borges *et al.* (2001) indican que en hembras bovinas, la dinámica folicular ocurre en forma de ondas, siendo descritas dos o tres ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral.

El reclutamiento no es un fenómeno aislado o al azar, al parecer los folículos al ser reclutados como grupo o cohorte han recibido anteriormente una señal que les permite crecer y desarrollarse en vez de sufrir regresión. La señal que estimula el reclutamiento parece ser una ligera elevación de FSH en plasma (Fortune, 1994), aunque no se conocen claramente los factores involucrados en el desarrollo final de los folículos preovulatorios; pero la ovulación del primer folículo dominante puede inducirse mediante la administración de un análogo de GnRH (Goulding *et al.*, 1993)

El final de la fase de selección se define, en la vaca, como el momento cuando un folículo (dominante) activo estrogénicamente, promueve su propio crecimiento e inhibe el crecimiento de otros folículos (Sunderland *et al.*, 1994).

En los bovinos se producen dos o tres ondas foliculares consecutivas por ciclo estral. En cada ola se produce el reclutamiento de una cohorte de folículos de la reserva ovárica total, y de éstos se selecciona un folículo dominante que continúa creciendo y madurando mientras que los demás sufren atresia (Ptaszynska y Molina, 2007).

De acuerdo con Forde *et al.* (2011), el crecimiento, desarrollo y maduración de los folículos ováricos es un proceso primordial para la alta eficiencia reproductiva en animales de granja. Durante el ciclo hay generalmente dos (vacas lecheras) o tres (vaquillas y vacas) ondas de crecimiento de folículos ováricos. El crecimiento del folículo consiste en un período de aparición de una cohorte de folículos (patrón que se denomina como ondas de crecimiento folicular), selección de un folículo dominante y atresia u ovulación del folículo dominante.

Webb *et al.* (2004), reporta que, la regulación de la actividad ovárica es un proceso integrado que abarca tanto señales extraováricas como factores intrafoliculares. Demarcando que, el inicio del crecimiento del folículo primordial y las etapas tempranas de la foliculogénesis pueden ocurrir sin o con gonadotropinas. Generalmente, los folículos reclutados expresan un rango de ARNm que codifica enzimas esteroideogénicas, receptores de gonadotropinas y factores reguladores locales y sus receptores.

Gigli *et al.* (2006), revalidan que la onda folicular se considera como la activación y crecimiento simultáneo de un grupo de folículos terciarios que emergen, continuando uno de ellos su crecimiento y diferenciación (folículo dominante) mientras que los otros (folículos subordinados), se atresian.

Fricke (2001), propone que, la emergencia del grupo o cohorte de pequeños folículos antrales inicia justo antes del día de la ovulación y durante los próximos días, donde el folículo que se hace dominante suprime el crecimiento de una nueva onda folicular. Mientras que el folículo dominante continúa aumentando de tamaño, el crecimiento de los restantes folículos de la cohorte cesa o se hace lento y estos folículos subordinados finalmente sufren atresia.

Por otra parte, Sirois y Fortune (1988), reportaron la presencia de dos, tres o cuatro ondas de crecimiento folicular por ciclo. Cada onda se caracterizó por el desarrollo de un folículo grande (dominante) y un número variable de folículos más pequeños (no dominantes). Ginther *et al.* (1989) y Wolfenson *et al.* (2004), refieren que en animales *Bos taurus taurus* predominan de dos a tres ondas por ciclo estral.

Figueiredo *et al.* (1997), demostraron además que, aunque el folículo dominante y el cuerpo lúteo son más pequeños que en las razas europeas, la dinámica folicular en el ganado Nelore fue similar a la observada en las razas europeas y se caracterizó por 2 o 3 ondas foliculares para vacas y vaquillas, respectivamente.

Gigli *et al.* (2006), en su trabajo de revisiones bibliográficas corrobora que, por ultrasonografía transrectal, se demostró que las ondas se desarrollan al azar en los dos ovarios, salvo en la preñez y el posparto temprano en donde la presencia del cuerpo lúteo de preñez determina el reclutamiento solamente en el ovario contralateral.

2.4.1. CRECIMIENTO FOLICULAR

Al nacimiento, los ovocitos de las especies mamíferas están bloqueados en la fase G2 de la profase de la primera división meiótica y tienen que reiniciar y completar la meiosis y la maduración para que la fecundación pueda llevarse a

cabo. La competencia meiótica, es decir, la capacidad de los ovocitos para reiniciar y completar la meiosis, se adquiere progresivamente durante el crecimiento folicular y ovocitario y está asociada a una serie de cambios nucleares y citoplasmáticos (Albarracín, 2005).

El desarrollo de los folículos comienza con la formación de los folículos primordiales en la etapa prenatal (en la mayoría de las especies), tras el nacimiento este proceso se interrumpe, y se reanuda en la pubertad (Geneser, 2005).

Los folículos primordiales constituyen la reserva de folículos en reposo, los cuales serán progresivamente reclutados para desarrollarse o eliminados durante la vida reproductiva de las hembras. En la mayoría de los mamíferos antes del nacimiento, las ovogonias, son transformadas en ovocitos primarios, los que se caracterizan por tener una profase meiótica prolongada. Estos son rodeados por una capa única de células somáticas aplanadas denominadas células foliculares. En esta fase, la superficie del ovocito está en estrecho contacto con la de las células foliculares y carece de células de la teca y tejido conectivo. La capa de células foliculares se apoya sobre una membrana basal que forma el límite con el tejido conectivo estromal (Dellmann y Eurell, 1998).

2.3. HORMONA ANTIMÜLLERIANA

Kawamata (1994) argumenta que la AMH es una glicoproteína que pertenece a los factores de transformación beta y la familia del factor de crecimiento, la cual es producida por células de la granulosa de folículos en crecimiento sanos.

La hormona AMH es una glicoproteína miembro de la súper familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-). Además de ser producida por las células de Sertoli en la embriogénesis para la diferenciación sexual, es producida en las células de la granulosa que rodean a los folículos antrales, preantrales y a los folículos pequeños, declinando su producción en los folículos dominantes. Desempeña un papel fundamental en la regulación del reclutamiento folicular y en el desarrollo de los ovocitos dentro del ovario (Unger y Beraja, 2010).

Su principal función fisiológica en el ovario es la inhibición del reclutamiento de folículos primordiales, además de reducir la sensibilidad de la FSH de los folículos en crecimiento. Con base en ello, su cuantificación representa un avance de gran valor clínico, puesto que su nivel en sangre se ha correlacionado con el número de folículos disponibles y se ha observado que es superior a la FSH y a la inhibina B (Hadlow, 2013).

En la actualidad, la AMH es el mejor marcador endócrino de la reserva folicular ovárica y de respuesta al tratamiento de estimulación ovárica en humanos (Gaughan *et al.*, 2007); y en el ganado (Fauser *et al.*, 2008). Se ha demostrado que las concentraciones de AMH pueden predecir la población folicular y el número de ovocitos en vacas y vaquillas (Ireland *et al.*, 2007).

En las mujeres, la AMH se expresa en células de la granulosa que rodean a los folículos antrales, preantrales y a los folículos pequeños, siendo éste su principal sitio de producción desde el nacimiento hasta la menopausia. La expresión de AMH continúa en los folículos en crecimiento y desaparece cuando éstos alcanzan un tamaño en el que pueden ser seleccionados por la FSH. En los folículos atrésicos y en las células de la teca no se observa expresión de AMH (Godoy *et al.*, 2012).

La AMH se expresa en los folículos que ya fueron reclutados, pero que aún no han sido seleccionados para ser dominantes. Esto indica que la AMH jugaría un rol importante tanto en la regulación del número de folículos en crecimiento (inhibiendo el reclutamiento), así como en su selección para ser liberados en la ovulación (reduciendo la sensibilidad a la FSH) (Ulloa *et al.*, 2012).

También refieren que si no existiera en la mujer habría un aumento del número de folículos en crecimiento, lo que agotaría prematuramente la reserva folicular. Los mecanismos que regulan la expresión de AMH en el ovario siguen siendo desconocidos, pero la expresión del receptor de AMH en células de la granulosa, sugiere que puede jugar un papel en la fisiología ovárica.

Monniaux *et al.* (2010) reportaron que, en la vaca, la AMH es un muy buen marcador endócrino de la población de pequeños folículos antrales que

constituyen el objetivo directo de los tratamientos de estimulación ovárica, pese a que otros factores extrínsecos como la época del año, pueden alterar resultados esperados.

Lozano *et al.* (2010) indican que las temperaturas elevadas provocan estrés calórico en los animales, lo cual afecta la viabilidad embrionaria y el medio ambiente materno para el establecimiento de la gestación, pese a que también la edad, nutrición y estación pueden ser otros factores que no favorezcan la gestación.

Un estudio realizado por Peña y Correa (2018), señala que los valores promedios de AMH para las variables de respuesta superovulatoria evaluadas fueron significativamente más elevados en vacas donadoras manejadas durante la época templada, por lo tanto afirma que la AMH puede ser considerada como un marcador endócrino eficiente asociado a las variables de respuesta superovulatoria cuando las vacas son manejadas durante la época templada o lluviosa, debido a que se observó un efecto negativo sobre la respuesta superovulatoria en vacas manejadas durante el verano.

Vales (2016) realizó un estudio de AMH como predictor de fertilidad en vacas sometidas a tratamientos superovulatorios, al medir las concentraciones séricas de la AMH en el momento de la inseminación, donde encontraron que todos los animales con valores menores a 80 $\mu\text{g/mL}$ tuvieron pocos embriones transferibles; y todos aquellos animales con valores mayores a 450 $\mu\text{g/mL}$ tuvieron muy buena cantidad de embriones transferibles.

2.3.1. ESTUDIOS DE AMH EN OTRAS ESPECIES

Se ha demostrado también, que la testosterona es capaz de inhibir la expresión de la hormona en las células de la granulosa. En un estudio realizado en la Universidad Austral de Chile, demostraron que en la exposición prenatal a un exceso de testosterona (EPT) en la oveja, traía como consecuencia una disminución en la expresión a nivel de ARN mensajero (ARNm) de la AMH, y del factor de transcripción nuclear kappa (NF κ B) en los folículos secundarios, por la modulación negativa que tiene la testosterona sobre el gen de la AMH a través del NF κ B (Rojas *et al.*, 2014).

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 preovulación. Se describió una inflexión en la curva de la AMH, que desciende significativamente su concentración desde el día 4 pico pre-ovulatorio 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 Sícara, 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 (Grinson y Rey, 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).

2.4. PROTOCOLOS MÚLTIPLE OVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (MOET)

Existen una gran cantidad de protocolos de superovulación para bovinos, los cuales pueden variar en tiempo, cantidad de dosis y manejo que se le da a los animales. Al seguir con las indicaciones de los protocolos se debe tener la mayor disposición y responsabilidad, ya que un simple error en cualquier fase del proceso, afectaría la respuesta al tratamiento hormonal que se está suministrando (Orellana y Peralta, 2007).

La técnica de consiste en la estimulación del ovario de la hembra para que produzca un mayor número de óvulos, para luego de ser fertilizada, ya sea natural o artificialmente, recuperar los embriones y transferirlos a hembras receptoras (Rodríguez, 2011).

La inducción de la superovulación se sucede en el diestro entre el día 8 y 14 del ciclo mediante la inyección de hormonas gonadotropas como la FSH, PMSG/ anti – PMASG o HCG. El celo superovulatorio se provoca finalmente con prostaglandina F₂α (Rodríguez, 2011).

La MOET se ha utilizado mucho en ganado bovino, para aumentar el número de animales puros de pedigrí, acelerando el progreso genético con animales superiores por el doble aporte (materno y paterno). A diferencia de la inseminación artificial en la que sólo el macho es tenido en cuenta como herramienta de mejoramiento, en la MOET la hembra juega también un importante papel (Vallejo *et al.*, 2011).

La producción de embriones permite incorporar hembras como fuente genética a multiplicar en los programas de mejoramiento. La técnica permite repetir la operación varias veces dentro de una misma estación, incrementando el número de corderos o terneros de una misma donante (Batista *et al.*, 2011).

Los conocimientos actuales señalan que la tasa de ovulación viene claramente definida por el número de folículos que se desarrollan y alcanzan el estado que les capacita para ovular tras el tratamiento y viene determinada tanto por las relaciones entre distintas hormonas del eje endócrino hipófisis-ovario que presentan efecto estimulante (FSH-LH) o inhibidor (estrógenos, inhibina) sobre el crecimiento de los folículos ováricos, como por las relaciones intraováricas entre ellos, autócrinas y parácrinas (Batista *et al.*, 2011).

2.6.1. SELECCIÓN DE VACAS DONANTES

La aptitud de un animal como donante para la transferencia de embriones se determina por su valor genético y su capacidad para lograr un alto nivel de resultado. Estos pueden ser óptimos si se puede seleccionar un animal que ya ha ofrecido buenos resultados en la transferencia. Se debe tener en cuenta que un tercio de las vacas donadoras no producen embriones transferibles (Salinas, 2011).

Reyes (2010) indica que la selección de donadoras es muy importante, ya que de ello depende el éxito de obtener un mejoramiento genético, sin embargo es muy importante hacer una rigurosa selección para tener la facultad de dar un buen número de embriones viables. Es por esto que la medida de las posibilidades en la preselección de las futuras donantes para un programa de TE, deberá ser sistemática y muy estricta en lo que concierne a calidad y estado fisiológico con el fin de asegurar respuestas ováricas altas y estables.

Como donadoras son válidas todas aquellas vacas adultas que no presenten ningún problema de tipo ginecológico. En última instancia se puede incluir en la transferencia de embriones animales que poseen, como mínimo, las condiciones anatómico-fisiológicas requeridas, esto es, deben presentar ciclos regulares y posibilitar la palpación rectal (Reyes, 2010).

Salinas (2011), ha sugerido que en la selección de las donadoras se utilicen los criterios siguientes: Haber presentado ciclos regulares desde temprana edad, no requerir más de dos servicios por concepción, no presentar defectos de conformación o genéticos detectables, tener de 3 a 10 años de edad, debe tener un promedio de día entre calores entre 17 y 24 días, no deben existir alteraciones

en su aparato reproductor (quistes, adherencias, infecciones, etc.) y las vacas deben ser de alto valor genético, deben ser animales libres de parásitos internos y externos y por último una condición corporal de 3 a 3,5 en escala del 1 al 5.

2.7.1. CLASIFICACIÓN DE EMBRIONES POR ESTADIO Y CALIDAD

Bó *et al.* (2011) han descrito que uno de los factores más importantes asociados con el éxito y la aplicación de la transferencia de embriones es la evaluación de los embriones antes de ser congelados y/o transferidos a una receptora.

Con el objetivo de facilitar la elección sobre qué embriones deben ser transferidos, congelados o exportados existe un sistema de codificación estandarizado creado por la International Embryo Transfer Society (IETS) (Stringfellow y Seidel, 1990) que se describe brevemente a continuación:

Mórula (Estadio 3): Una masa de al menos 16 células. Los blastómeros individuales son difíciles de discernir unos de otros. La masa celular del embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.

Mórula compacta (Estadio 4): Los blastómeros individuales se han unido, formando una masa. La masa embrionaria ocupa del 60 al 70% del espacio perivitelino.

Blastocisto temprano (Estadio 5): El embrión ha formado una cavidad llena de líquido o blastocele y adquiere una apariencia general de un anillo de sello. El embrión ocupa el 70 a 80% del espacio perivitelino. En esta etapa la calidad del embrión puede ser cuestionable porque es difícil diferenciar la masa celular interna de las células trofoblásticas.

Blastocisto (Estadio 6): Diferenciación pronunciada de la capa trofoblástica externa y de la capa celular interna (más oscura). El blastocele es altamente prominente, con el embrión ocupando la mayor parte del espacio perivitelino. En esta etapa del desarrollo es posible la diferenciación visual entre el trofoblasto y la masa celular interna.

Blastocisto expandido (Estadio 7): El diámetro del embrión aumenta hasta un 150%, con un adelgazamiento de la zona pelúcida a aproximadamente un tercio de su espesor original.

Blastocisto eclosionado (Estadio 8): En esta etapa la masa celular puede estar en proceso de eclosión o estar completamente fuera de la zona pelúcida. La identificación durante esta etapa puede ser difícil y requiere de un operador experto.

Blastocisto eclosionado expandido (Estadio 9).

Además los códigos para la calidad del embrión son numéricos (1 a 4) y se basan en la integridad morfológica de los embriones. A continuación se presenta la clasificación propuesta por (Stringfellow y Seidel, 1990):

Grado 1. Excelente o Bueno: Tienen una masa simétrica y esférica con blastómeros que son uniformes en tamaño, color y densidad. Este embrión es consistente con la etapa de desarrollo esperada. Las irregularidades deben ser mínimas, y al menos el 85% del material celular debe estar intacto, viable. La zona pelúcida debe ser lisa y no tener concavidades o superficies planas que puedan causar que el embrión se adhiera a una placa de Petri o una pajueta. Estos embriones sobreviven bien a la congelación/ descongelación y se recomiendan para el comercio internacional.

Grado 2. Regulares: Tienen irregularidades en la forma general de la masa embrionaria o en el tamaño y color de las células individuales. Al menos el 50% de la masa embrionaria debe estar intacta. La supervivencia de estos embriones al procedimiento de congelación/ descongelación es inferior al grado 1, pero las tasas de preñez son adecuadas si los embriones son transferidos en fresco a las receptoras.

Grado 3. Pobre: Tienen irregularidades en la forma de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 25% de la masa del embrión debe estar intacta. Estos embriones no sobreviven al

procedimiento congelación/ descongelación y las tasas de preñez son inferiores en la transferencia en fresco.

Grado 4. Éstos podrían ser embriones, ovocitos o células embrionarias. No son viables y deben ser desechados.

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

El presente trabajo fue realizado en la Hacienda Aura Germania del cantón Paján, que posee una dimensión de 1.088,23 km², se encuentra en las coordenadas 01 °, 33' y 0" de latitud Sur y 80 °, 25' 60" de longitud Oeste; a 110 metros sobre el nivel del mar, en la provincia de Manabí. Fuente: (INEC, 2017).

3.2. CONDICIONES CLIMÁTICAS

La temperatura media anual de sitio de la investigación es de 24 °C promedio, con precipitaciones medias anuales de entre 1000 y 2000 mm/año y humedad relativa anual 87 %. Se caracteriza por ser un clima tropical y fresco, con marcada diferencia entre la época seca y la época lluviosa. Es importante recalcar que esta tesis fue efectuada en la época lluviosa. Fuente: (INEC, 2017).

3.3. DURACIÓN DEL TRABAJO

La investigación tuvo una duración de 4 meses, inició el día 4 de enero de 2018 y culminó el día 7 de abril de 2018.

3.4. FACTOR (ES) EN ESTUDIO

Niveles séricos de AMH en donadoras Brahman.

3.5. UNIDAD EXPERIMENTAL

Las unidades en estudio fueron 10 hembras bovinas de la raza Brahman.

3.6. VARIABLES EN ESTUDIO

3.6.1. VARIABLE INDEPENDIENTE

Niveles de hormona Antimülleriana (pg/mL).

3.6.2. VARIABLES DEPENDIENTES

Total de folículos presente en el recuento folicular (número)

Total de cuerpos lúteos (número)

Total de folículos anovulatorios (número)

Total de estructuras ováricas (número)

Total de embriones (número)

Total de embriones degenerados (número)

Total de ovocitos fertilizados (número)

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos fueron analizados con el software estadístico Statistix 8.0, además se efectuaron análisis de correlación de Pearson de las variables bajo estudio (niveles de AMH, total de folículos presentes en el recuento folicular, total de cuerpos lúteos, total de folículos anovulatorios, total de estructuras ováricas y total de embriones), y para las medias se procedió a analizarlas por medio de la prueba T- Student (0,05%). Para conocer la significancia probabilística de los distintos factores en estudio, luego se realizó el análisis de regresión para un estudio de relaciones funcionales. Los niveles de AMH fueron divididos en rangos de 100 a 255 y 256 a 700 picogramos/mililitro (pg/mL) para efectuar un análisis más profundo entre las variables. Los resultados se presentaron en cuadros y gráficos usando Microsoft Word.

3.8. PROCEDIMIENTO

Se eligió donadoras que poseían características genéticas superiores (determinación mediante la revisión de los registros de cada una) y condición corporal (CC) de 2,75 a 3 (escala del 1 al 5; donde 1 es emaciada y 5 gorda) por determinación visual de un solo operador.

Luego del procedimiento antes señalado, se tomaron las muestras de sangre (4mL) obtenidas por punción de la yugular, para ello se empleó tubos al vacío con heparina de sodio (BD Vacutainer® NH; Becton Dickinson and Co., USA).

Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su posterior envío al laboratorio. Luego fueron procesadas en el laboratorio de UNIMEVET, en donde se las sometió a centrifugación refrigerada (3200 revoluciones/minutos a 4°C) y almacenadas inmediatamente a -20° C hasta su posterior análisis por ELISA para determinar los niveles séricos de AMH.

Se efectuó una prueba de ELISA para determinación de AMH en suero sanguíneo de las vaquillas experimentales se efectuó con el uso de 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 fueron medidas en muestras de 50 µL de suero.

Las muestras de suero fueron descongeladas en baño de maría justo antes de la prueba de ELISA, sometidas a sacudido en vortex (MRC, Modelo: SI-100) y centrifugadas (C2203, Liston) a 3,200 revoluciones/minuto a 4°C. Seguidamente, las muestras se incubaron 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 inmediatamente hacer las lecturas.

Luego se realizó ultrasonografía con transductor lineal con 7,5 MHz y en modo B (Mindray DP50VET®, Shenzhen, China) a las donadoras seleccionadas en 4 momentos al azar del ciclo estral, y se contó el número de folículos presentes en cada una de las ultrasonografías. Por último se procedió a aplicar los respectivos protocolos de superovulación:

En el Día 0 todas las hembras recibieron un dispositivo de silicona inerte impregnado con 0,5 g de progesterona natural de liberación controlada para un solo uso (DIB® 0.5 Zoetis; Argentina) en vaquillas y dispositivo de 1g en vacas (DIB 1gr; Zoetis). Además, todas fueron tratadas por única vez con 2,5 mL de benzoato de estradiol (1mg/1mL; Gonadiol Zoetis) vía i.m, también se aplicó una dosis única 50mg que equivalió a 2mL de progesterona (25mg/mL Gestavec Vecol; Colombia).

Posteriormente entre los días 4, 5, 6 y 7 se aplicó un total de 5 mL de (Pluset® Calier; Argentina) en las vaquillas, equivalente a 250UI de FSH y LH, distribuido en dosis decrecientes dos veces al día (6H00 y 18H00) como protocolo superovulatorio, 50, 50, 25, 25, 25, 25, 25, y 25 UI de FSH y LH por vez, lo cual equivalió a (1.0, 1.0, 0.5, 0.5, 0.5, 0.5, 0.5, y 0.5 mL de pluset) vía i.m.

De manera similar en las vacas se aplicó un total de 7 mL de (Pluset Calier), equivalente a 350UI de FSH y LH, distribuido en dosis decrecientes dos veces al día (6H00 y 18H00), fueron 75, 75, 50, 50, 25, 25, 25, y 25 UI de FSH y LH por

vez, lo cual equivalió a (1.5, 1.5, 1.0, 1.0, 0.5, 0.5, 0.5, y 0.5 mL de pluset) vía i.m.; el día 7 a todas las hembras se les aplicó 0.5 mg de cloprostenol vía i.m., análogo sintético de prostaglandina (PGF_{2a}, 2 mL de Sincrocio Ourofino; Brasil) por la mañana y por la tarde (6H00 y 18H00), además se retiraron los dispositivos DIB por la tarde.

La primera inseminación artificial (IA) se realizó a todas las donadoras a las 48 horas después de la primera aplicación de PGF_{2a}, además se aplicó una dosis (100µg que equivalió a 2mL) de GnRH (Ovarelin CEVA SANTE; Francia) y la segunda IA se la realizó 24 horas después (Anexo 18-A, 18-B).

El lavado uterino de las donantes se realizó 7 días después de la inseminación artificial. Todos los materiales utilizados fueron estériles, primero se colocó a la vaca donante en una manga, se rasuró y lavó la base de la cola y la vulva, se aplicó 2 mL de anestesia epidural (lidocaína al 2%) para inmovilizar la cola del animal y evitar las contracciones rectales.

Luego se realizó ultrasonografía con transductor lineal con 7,5 MHz y en modo B (Mindray DP50VET®, Shenzhen, China) para determinar el número de cuerpos lúteos y de folículos anovulatorios antes de la cateterización de la donante.

Posteriormente se procedió a realizar la colecta de embriones utilizando la técnica de circuito abierto con flujo discontinuo, mediante la cual se introdujo la mano por el recto para la manipulación del cérvix y de los cuernos uterinos, luego se procedió a introducir un mandril cubierto por un catéter flexible de dos vías armado a partir una sonda (Bioniche Animal Health Inc., Pullman, WA, USA), calibre 20 para las vacas y calibre 16 para las vaquillas, previamente esterilizado con alcohol y luego pasado por PBS.

Una vez introducida la sonda Bioniche Animal Health junto con el mandril, se llevó la sonda hasta uno de los cuernos, los más profundo que se pudo pero sin lastimar el tracto, una vez ubicado se inyectó con aire por la vía que se dirige hacia el balón del catéter con 8 - 15 mL aproximadamente, de esta manera quedó fijada la sonda al cuerno, se extrajo el mandril y se procedió con inyecciones cargadas de medio buffer fosfato salino (PBS) con volúmenes entre 20 mL a 50

mL por cada inyección (10 – 12 inyecciones) hasta completar aproximadamente 500 mL por cada cuerno.

Por otra parte mientras se inyectaba el PBS con la mano que se encontraba en el recto se controlaba el llenado del cuerno, una vez lleno se procedió a masajear la porción del cuerno llenada para luego extraer el volumen inyectado; y depositarlo en los filtro para embriones (Filtro Em-Con TM; INCOLAmerica, Colombia) este proceso se repitió de manera similar en el otro cuerno uterino, finalmente después de que se lavó ambos cuernos, se aplicó una dosis de prostaglandina (PGF2a, 2 mL de Sincrocio Ourofino) a todas las donadoras.

Después de recuperado el medio de lavado los embriones fueron aislados del volumen total mediante métodos de filtración y drenaje (Filtro Em-Con TM; INCOLAmerica, Colombia), para poder realizar su evaluación morfológica y determinar su utilización posterior en un microscopio de contraste de fase. Se utilizó medio holding de mantenimiento (Vigro Holding Plus, Bioniche Animal Health, Inc., Pullman, WA, USA).

Los embriones fueron catalogados tomando de referencia a la IETS y de acuerdo a su estadio de desarrollo, nombrándoles del 1 (estadio de una célula) al 9 (estadio de blastocito eclosionado), y según su calidad (1 a 4): excelente o bueno, regular, pobre, malo o no transferible. (Anexo 17-A, 17-B).

3.9. OBTENCIÓN DE LAS VARIABLES

Total de folículos presente en el recuento folicular (RF): fueron determinados mediante ultrasonografía, en 4 momentos distintos del ciclo estral, fueron determinados al azar.

Total de cuerpos lúteos totales (CLT): Fueron determinadas por ultrasonografía antes de realizar la cateterización de la donante, como predictores de las estructuras ovarios embrionarios.

Total de folículos anovulatorios (FA): Los folículos anovulatorios fueron determinada por ultrasonografía antes de la cateterización de la donante.

Total estructuras ováricas (EO): Fue determinada mediante la observación en el microscopio, además para la determinación de embriones aptos para ser transferidos se observaron características como: compactación de las células, regularidad de la forma del embrión, variación en el tamaño de las células, color y textura de citoplasma, presencia de vesículas, células extruídas y diámetro y regularidad de la zona pelúcida. Se utilizó la clasificación propuesta por IETS.

Grado 1: Excelente o bueno (> 85% de integridad morfológica)

Grado 2: Regular (> 50% de integridad morfológica)

Grado 3: Pobre (> 25% de integridad morfológica)

Grado 4: Éstos podrían ser embriones, ovocitos o células embrionarias. No son viables y deben ser desechados.

Durante el estudio se consideró embriones aptos para ser transferidos a aquellos que contaban con grado 1 y 2.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE LAS VARIABLES

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación, se rechaza la hipótesis planteada, porque no existe correlación entre los niveles de AMH y los embriones transferibles que se obtuvieron en donadoras Brahman sometidas a protocolo de superovulación.

Aunque en el Cuadro 4.1 se muestra el análisis de correlación de Pearson entre las variables estudiadas, se evidencia que existe correlación por la prueba de t a 5% de probabilidad entre los niveles de AMH, con el total de folículos presente en el recuento folicular ($P=0.06$).

Otra correlación positiva fue observada con las variables total de estructuras ováricas y total de embriones ($P=0.007$), además de cuerpos lúteos y total de embriones ($P=0.015$), así mismo los ovocitos infertilizados muestran una correlación con el total de embriones ($P=0.016$) (Cuadro 4.1)

Cuadro 4. 1. Coeficientes de correlación de Pearson para las variables total de folículos presente en el recuento folicular, total de estructuras ováricas, total de embriones, cuerpos lúteos, y ovocitos infertilizados.

	AMH(pg/mL)	Total de estructuras ováricas	Total de embriones	Total de embriones degenerados	Total de ovocitos infertilizados	Total de folículos presente en el recuento folicular	Total de cuerpos lúteos	Total de folículos anovulatorios
AMH (pg/mL)	1.00000	0.26065	-0.11658	-0.09441	0.34935	0.60004	-0.37695	-0.28619
		0.4670	0.7484	0.7953	0.3224	0.0667	0.2829	0.4228
Total de estructuras ováricas (EO)	0.26065	1.00000	0.77932	-0.38034	0.94836	0.26728	0.58245	-0.05264
	0.4670		0.0079	0.2783	<.0001	0.4553	0.0773	0.8852
Total de embriones (TE)	-0.11658	0.77932	1.00000	-0.59056	0.72821	-0.11098	0.73624	0.00791
	0.7484	0.0079		0.0722	0.0169	0.7602	0.0152	0.9827
Total de embriones degenerados (ED)	-0.09441	-0.38034	-0.59056	1.00000	-0.60495	-0.00897	-0.54676	0.39487
	0.7953	0.2783	0.0722		0.0639	0.9804	0.1019	0.2588
Total de ovocitos infertilizados (OI)	0.34935	0.94836	0.72821	-0.60495	1.00000	0.32054	0.58977	-0.21484
	0.3224	<.0001	0.0169	0.0639		0.3665	0.0727	0.5511
Total de folículos presente en el recuento folicular (TRF)	0.60004	0.26728	-0.11098	-0.00897	0.32054	1.00000	-0.35281	0.09694
	0.0667	0.4553	0.7602	0.9804	0.3665		0.3173	0.7899
Total de cuerpos lúteos (CL)	-0.37695	0.58245	0.73624	-0.54676	0.58977	-0.35281	1.00000	-0.33915
	0.2829	0.0773	0.0152	0.1019	0.0727	0.3173		0.3377
Total de folículos anovulatorios (FA)	-0.28619	-0.05264	0.00791	0.39487	-0.21484	0.09694	-0.33915	1.00000
	0.4228	0.8852	0.9827	0.2588	0.5511	0.7899	0.3377	

Esta respuesta de relación estructural entre las variables correlacionadas explica la influencia del nivel de AMH sobre la producción de folículos. Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Benyei *et al.* (2003), quienes encontraron que las concentraciones de AMH están correlacionadas con el recuento de folículos antrales del ovario, Así mismo, Center *et al.* (2018) también encontraron correlaciones positivas entre la AMH y el número de folículos.

De igual forma Peña y Correa (2018) resaltan la alta correlación entre la concentración de AMH y la cantidad de folículos producidos por las vacas donadoras, lo cual indica que entre más elevados sean los niveles séricos de AMH, mayor será la respuesta folicular obtenida en la vaca donadora.

4.2. INFLUENCIA DE LOS RANGOS DE AMH

4.2.1. VARIABLE TOTAL DE FOLÍCULOS PRESENTES EN EL RECUESTO FOLICULAR.

El cuadro 4.2. (Anexo 1), se evidencia que existieron diferencias significativas entre los rangos ($p < 0,05$), esto indica que entre mayor sean los niveles séricos de AMH, mayor será el número de folículos presentes en las vacas donadoras.

Cuadro 4.2. Total de folículos presentes en el recuento folicular

Variable		
Rangos	Total de folículos presentes en el recuento folicular \pm (EE)	P valor
100 a 255 ($\mu\text{g/mL}$)	49,80 \pm (7,94)	0,0031
256 a 700 ($\mu\text{g/mL}$)	87,20 \pm (9,30)	

Las medias difieren significativamente ($P < 0,05$).

Los resultados mostrados se sustentan con base a varios estudios que afirman que altos niveles de esta hormona se verán reflejados en una mejor respuesta folicular en el animal. Un análisis realizado en ganado bovino por Ireland *et al.* (2007), muestra que las concentraciones de AMH fueron aproximadamente 6 y 2 veces mayores en animales con un recuento de folículos antrales altos o intermedios, respectivamente, en comparación con los de baja concentración.

De igual forma Peña y Correa (2018) destacan la alta correlación entre la concentración de AMH y la cantidad de folículos producidos por las vacas donadoras, lo cual indica que entre más elevados sean los niveles séricos de AMH, mayor será la respuesta folicular obtenida en la vaca donadora.

4.2.2. VARIABLE DE CUERPOS LÚTEOS TOTALES.

En el cuadro 4.3. (Anexo 2) los resultados rechazan la hipótesis, no se obtuvo diferencia significativa entre los rangos para la variable total cuerpos lúteos, sin embargo, numéricamente el rango 1 fue superior con un promedio de 10,40 a diferencia del rango 2 que tuvo un promedio de 8.40.

Cuadro 4.3. Total de cuerpos lúteos.

Rangos	Variable	
	Total de cuerpos lúteos \pm (EE)	P valor
100 a 255 (pg/mL)	10,40 \pm (1,29)	0.6636
256 a 700 (pg/mL)	8,40 \pm (3,54)	

Las medias no difirieron significativamente ($P>0,05$)

Estos datos son superiores a los obtenidos por Salinas (2013) que al comparar dos tratamientos superovulatorios en 20 vacas Holstein Friesian en la provincia de Chimborazo, T1 8FSH (total FSH 360mg; Folltropin-V) + eCG 400 UI y T2 8FSH (total FSH 360mg; Folltropin-V) sin eCG; encontraron que para el grupo de vacas tratadas con eCG+ FSH existió un promedio de cuerpos lúteos totales de (6.2 \pm 2.80) y para el grupo de vacas tratadas solo con FSH 8.2 \pm 3.16 ($p>0,05$).

Además, son inferiores a los obtenidos por González y Mendoza (2017) en su investigación de sobre dos protocolos de superovulación y su efecto en donantes de embriones en vacas mestizas de leche en el trópico, en cuanto al total de cuerpos lúteos numéricamente fue superior el tratamiento 2 con una media de 14.60 \pm 2.4 en relación al tratamiento 1 que obtuvo 13.40 \pm 2.4.

4.2.3. VARIABLE TOTAL DE FOLÍCULOS ANOVULATORIOS.

En el cuadro 4.4. (Anexo 2), se puede apreciar que no se encontraron diferencias significativas entre los rangos para las variables folículos anovulatorios, a pesar de esto numéricamente en el rango 1 se obtuvo una media de 4,20 que es superior en relación al rango 2 en el que el promedio obtenido fue 3,60.

Cuadro 4.4. Total de Folículos anovulatorios.

Rangos	Variable	
	Total de Folículos anovulatorios.± (EE)	P valor
100 a 255 (pg/mL)	4,20 ± (0,97)	0.8448
256 a 700 (pg/mL)	3,60 ± (2,06)	

Las medias no difirieron significativamente (P>0,05)

Estos resultados son superiores a los obtenidos por Salinas (2013), en el tratamiento con eCG se obtuvo un promedio $1 \pm 1,33$ folículos que no pudieron ovular y al contrastar con los FA obtenidos en el tratamiento sin esta hormona en un promedio de $1,8 \pm 1,79$.

Estos datos son inferiores a los reportados por Gordillo (2015) al realizar el análisis estadístico de las variables folículo anovulatorio obtuvo que la cantidad de folículos anovulatorio totales tuvo un promedio de $7,70 \pm 0,59$. Al comparar con los datos de Baruselli *et al.* (2006), quienes evaluaron el efecto de retrasar la ovulación en donantes Nelores (*Bos indicus*) al utilizar un tratamiento con LH después de 12 a 24h de la última dosis de Folltropin-V, obtuvieron 12.5 ± 1.5 .

4.2.4. VARIABLE ESTRUCTURAS OVÁRICAS.

En el Cuadro 4.5. (Anexos 4, 5, 6 y 7), se observa que no hubo diferencia significativa entre los rangos para las variables estructuras ováricas, total de embriones, embriones degenerados y ovocitos infertilizados, sin embargo, numéricamente en el rango 2 se obtuvo mayor cantidad de estructuras ováricas con una media de 12,20 en comparación del rango 1 que se obtuvo 10,00.

Con lo que respecta al total de embriones, en el rango 1 se obtuvo una media de 1,60 que es superior en relación al rango 2 en el que el promedio obtenido fue 1,20. En los embriones degenerados en el rango 1 se obtuvo una media de 1,20 que es inferior en relación al rango 2 en el que el promedio obtenido fue 1,60.

Además, en los ovocitos infertilizados en el rango 1 se obtuvo una media de 7,20 que es inferior en relación al rango 2 en el que el promedio obtenido fue 10,00 lo que demuestra que a pesar de que presentan mayores estructuras ováricas se obtuvo un mayor número de ovocitos infertilizados.

Cuadro 4.5. Estructuras ováricas.

Rangos	Variables			
	Total de estructuras ováricas.± (EE)	Total de embriones.± (EE)	Total Embriones degenerados.± (EE)	Total de ovocitos infertilizados.± (EE)
100 a 255 (pg/mL)	10,00 ± (1,38)	1,60 ± (0,51)	1,20 ± (0,57)	7,20 ± (1,85)
256 a 700 (pg/mL)	12,80 ± (3,14)	1,20 ± (0,57)	1,60 ± (0,93)	10,00 ± (2,66)
P valor	0.4330	0.5870	0.7780	0.3947

Las medias no difirieron significativamente (P>0,05)

Estos datos son inferiores a los encontrados por Callejas (2001) obteniendo $6,3 \pm 0,7$ embriones recuperados pos-colecta, pese a que el número de cuerpos lúteos fueron totalmente superior, lo que hace pensar que probablemente el semen utilizado en las donadoras fue de mala calidad ya que existió una cantidad alta de ovocitos infertilizados ($7,20 \pm (1,85)$ en el rango de 100 a 255 pg/mL) y ($10,00 \pm (2,66)$ en el rango de 256 a 700 pg/mL).

Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos en el trabajo experimental realizado por Monniaux *et al.* (2010), en el cual estos autores observaron que había una correlación positiva entre la concentración de AMH de las vacas donadoras y el número de embriones obtenidos por vaca. La asignación de las vacas donadoras a diferentes grupos según la concentración de AMH puso en evidencia que las vacas con concentraciones plasmáticas de

AMH entre 100 a 200 pg/mL y mayores a 200 pg/mL produjeron mayor cantidad de embriones transferibles que las vacas con valores menores a 100 pg/mL de AMH.

En otro estudio realizado por Guerreiro *et al.* (2014), las donadoras clasificadas con niveles altos de AMH produjeron un número significativamente mayor de embriones (Holstein: 3,0; Nelore: 7,0) en comparación con aquellas de bajos niveles de AMH (Holstein: 1,2; Nelore: 2,2).

Son inferiores a los obtenidos por Zanenga *et al.* (2003) donde el número de embriones degenerados obtenido en vacas Brahman es similar en vacas Nelore con un promedio de 4.8, sin embargo, Martins *et al.* (2005) reportaron un promedio inferior (0.7 embriones degenerados por donadora), en vacas Nelore.

Vieira *et al.* (2014) en su investigación encontró un efecto negativo de la estación cálida que reducía el número de embriones producidos *in vivo* (embriones producidos $2,8 \pm 0,3$ vs. $4,4 \pm 0,4$; $P = 0,03$) y el porcentaje de embriones clasificados como de grado I y II (21.4 vs. 32.8%, $P < 0,0001$).

4.2.5. TOTAL DE EMBRIONES EN VACAS Y VAQUILLAS.

En el cuadro 4.6. (Anexo 8), se puede observar que no se encontraron diferencias estadísticas del total de embriones entre vacas y vaquillas, a pesar de esto las vaquillas obtuvieron una media de 1,60 que es superior en relación a las vacas en el que el promedio obtenido fue 1,25.

Cuadro 4.6. Total embriones en vacas y vaquillas.

Grupo	Indicador	
	Total embriones en vacas y vaquillas ± (EE)	P valor
Vacas	1,25 ± (0,75)	
Vaquillas	1,60 ± (0,93)	0.6672

Las medias no difirieron significativamente ($P > 0,05$)

Al respecto Becaluba (2007), señala que el efecto que tiene la edad de la donante sobre la respuesta superovulatoria ha sido muy estudiado en ganado lechero, obteniendo un número mayor de embriones transferibles en las donadoras de 3 a 6 años que en las vaquillas 2 años y las vacas mayores de 10 años; sin embargo, Moreno (2004), reporta que las vacas donadoras responden con mayor facilidad a los tratamientos de superovulación cuando están jóvenes.

4.3. ANÁLISIS DE REGRESIÓN

El análisis de regresión entre los niveles de AMH y el número total de folículos (Gráfico 4.1) mostró diferencias significativas, con presencia de un ajuste cuadrático.

Este comportamiento indica que ocurre incremento de la producción de folículos en la medida que aumentan los niveles de AMH, alcanzando el máximo valor cuando el nivel de la hormona se ubica alrededor de 307,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$; a partir de ese nivel hormonal ocurre el descenso en la formación de folículos.

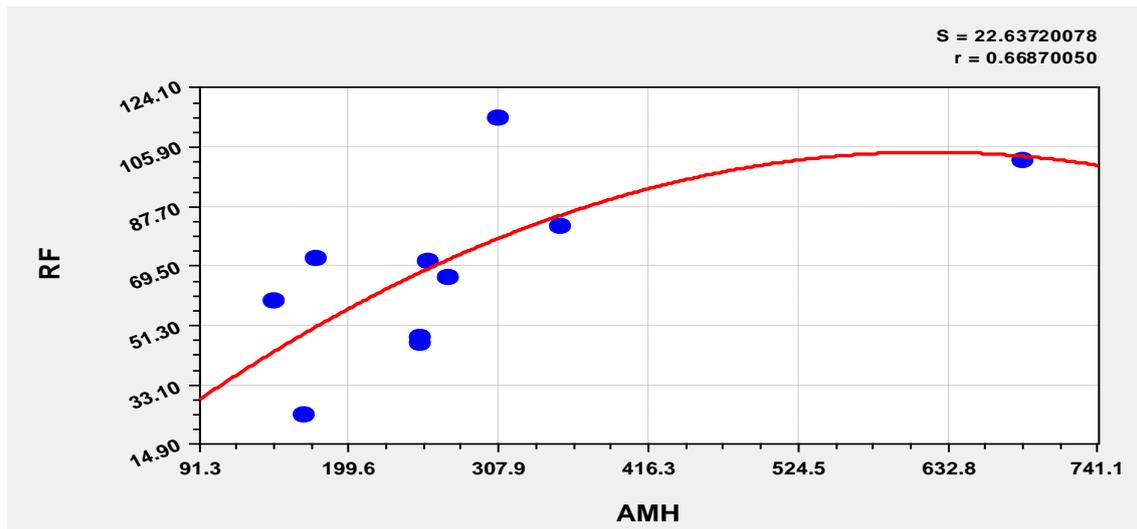


Gráfico 4. 1. Curva del número total de folículos en función de los niveles de AMH. RF en eje de las Y en función de AMH en el eje X.

De manera similar, cuando se realizó el análisis de regresión para establecer relaciones entre los niveles de AMH y el número de cuerpos lúteos, se encontró un ajuste cuadrático con un coeficiente de regresión de 0,53 el cual resultó mediadamente significativo al 5% de probabilidad.

Se observa en el gráfico 4.2 que el número de cuerpos lúteos aumentan regularmente hasta cuando el nivel de AMH es de aproximadamente de 280,0 pg/mL y alcanza el máximo valor en el momento en que el nivel de la hormona se ubica alrededor de 360,0 pg/mL; a partir de ese nivel hormonal ocurre el descenso abrupto en la formación cuerpos lúteos.

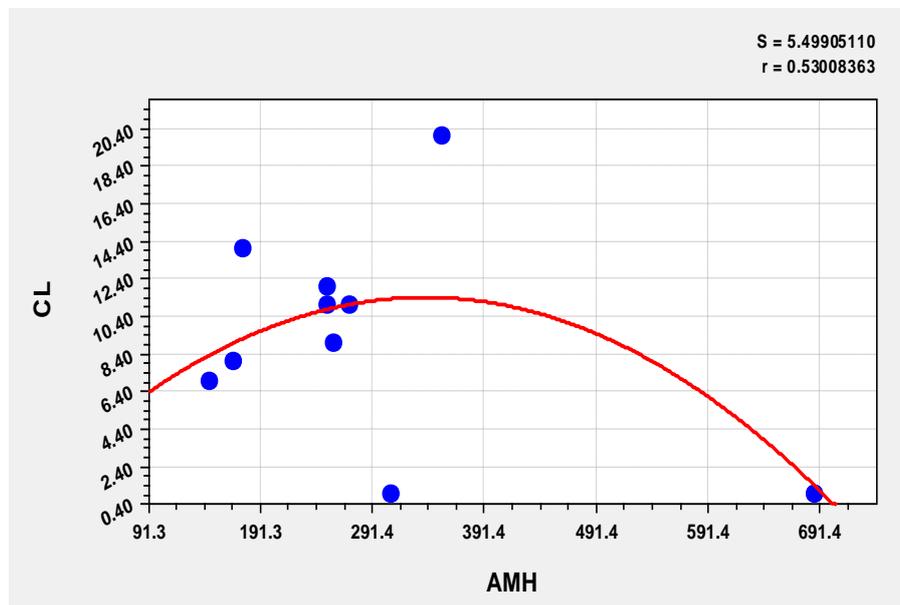


Gráfico 4. 2 Curva del total de cuerpos lúteos en función de los niveles de AMH. CL en eje de las Y en función de AMH en el eje X.

Investigaciones de Peña y Correa (2018) mostraron que el nivel de AMH resultó ser un predictor del número de folículos, cuerpos lúteos y embriones recolectados en respuesta a la superovulación, lo que permite estimar que por cada 1,000 pg/mL de AMH en sangre muestran incrementos en el número de folículos, cuerpos lúteos y embriones recolectados de 5,08; 2,52 y 1,42, respectivamente lo cual coincide con lo reportado por Ireland *et al.* (2007), quienes postulan a la AMH como un predictor de la reserva folicular ovárica.

Batista *et al.* (2014) informaron que las vaquillas *Bos indicus* tenían mayor AMH circulante que las vaquillas *Bos taurus* (930 vs. 300 pg/mL); por otro lado, Ribeiro *et al.* (2014) encontraron que las vacas mestizas Jersey y Holstein x Jersey tenían mayores concentraciones plasmáticas de AMH que las vacas Holstein (337 y 298 vs. 264 pg/mL) y que las vacas segunda y tercera lactancia (independientemente de la raza) tenían AMH plasmática más alta que las de

primera y cuarta lactación (342 y 328 frente a 257 y 273 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Las donadoras con niveles séricos de AMH en el rango alto (256 a 700pg/mL), reportaron el mayor número de folículos presentes en el recuento folicular, sin embargo esto no se correlacionó con el número de embriones aptos para ser transferidos.

Los niveles séricos de AMH no demostraron influencia sobre el número de cuerpos lúteos en donadoras Brahman.

Los niveles de AMH no influyen en la producción de embriones transferibles que se obtuvieron en las donadoras Brahman sometidas a protocolo de superovulación.

5.2. RECOMENDACIONES

Considerar la época del año al momento de efectuar futuras investigaciones sobre la relación entre los niveles de AMH, la respuesta superovulatoria y la producción de embriones *in vivo*.

Realizar futuros estudios a donadoras con niveles séricos de AMH por encima de 200 pg/mL para aspiración folicular y fecundación *in vitro* y su correlación con la producción de embriones.

BIBLIOGRAFÍA

- Albarracín, J., 2005. Vitrificación de Ovocitos Bovinos Mediante la Técnica Open Pulled:(Tesis Doctoral). Uni. Aut. De Barcelona España.
- 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 y Avendaño, C. 2015. 11 Simposio internacional de reproducción animal iracbiogen - 2015. Efecto de los valores de hormona antimülleriana y el número de ovocitos en vacas brangus.
- Baruselli, P., de Sá, M., Martins, C., Nasser, L., Nogueira, M., Barros, C., y Bó, G. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 65(1), 77–88.
- Baruselli, P., Batista, S., Vieira, L., y Souza, A. 2015. Manipulación de la dinámica folicular y efectos del número de folículos y de la hormona antimülleriana (AMH) sobre la fertilidad. Xi simposio internacional de reproducción animal (pág. 43). São Paulo: IRAC.
- Batista, O., Macedo, V., Sala, D., Ortolan, F., SáFilhoC, A., Del Valle, F., Jesus, R., Lopes, P., Rennó, P Y Baruselli. 2011. Plasma antimüllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. *Reprod. Domest. Anim.* 49(3):448-452.
- Becaluba, F., Factores que afectan la superovulación en bovinos., 2007. (HTML.). Recuperado de <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/factores-afectan-superovulacion-bovino-t27257.htm>
- Benyei, B Y Gáspárdy, C., 2003. Effect of the El Niño phenomen on the ovarian responsive and embryo production of donor cows. *Acta Vet Hung.* 51(2):209-218.
- Bó, G.y Mapletoft R. 2003. Superovulación en Bovinos. En: Reproducción en los animales domésticos, Tomo II. R. Ungerfeld. Montevideo, Uruguay. pp. 515-538.
- Bó, G., Tríbulo, A; Mapletoft, R. 2011. Nuevos protocolos de superovulación para programas de transferencia de embriones en bovinos. PE. SPERMOVA. 1: 26- 33.
- Borges, A., Torres, C., Ruas, J., Rocha, V., y Carvalho, G. 2001. Dinámica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 53: 595-604.

- 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.
- Climent, S., Sarasa, M., Muniesa, P., Terrado, J., y Climent, M. 2012. *Embriología y anatomía veterinaria*. Zaragoza, España: ACRIBIA, S.A.
- De Caro R. y Sícara L. 2008. Hormona Antimülleriana de la Embriología a la Fertilidad. *Saegre*. : 1-27.
- Dellmann, H y Eurell, A. 1998. *Textbook of veterinary histology*, 5th ed.
- Diskin, M., Austin, y Roche, J. 2002. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*. 23, 211-228.
- Evkuran, D., Alcigi, 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 Higt GATA-4, Inhibin-a, AMH Expressions . *Journal Home Page*. 19:237-242.
- Figueiredo, R., Barros, C., Pinheiro, O., Soler, J. 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) CATTLE. *Theriogenology*. 47. 1489-505. 10.1016/S0093-691X(97)00156-8.
- Forde, N., Beltman, M., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J., Crowe, M. (2011). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal reproduction science*. 124. 163-9. 10.1016/j.anireprosci.2010.08.025.
- Fortune, J. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. of Reprod.*, 50, 225.
- Fricke, P. y Shaver, R. 2001. *Manejando trastornos reproductivos en Vacas Lecheras*. Departamento de Ciencias Lácteas Universidad de Wisconsin-Madison 1675 Observatory Drive Madison, WI 53706
- Geneser, F. 2005. *Histología*, 3ra edición, Editorial Médica Panamericana. P.813.
- Gigli, I., Russo, A y Agüero, A. 2006. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *Revista In. Vet. InVet*. 2006, 8(1): 183-204. Buenos Aires, AR. p 196-198
- Godoy, HS., Rivas, R y Cedillo, L. 2012. Hormona antimülleriana como marcador de respuesta ovárica en fertilización in vitro. *Ginecol Obstet Mex*; 80(1): 1-7.
- Gonzales, E y Mendoza, I. 2017. Dos protocolos de superovulación y su efecto en donantes de embriones en vacas mestizas de leche en el trópico. (Tesis pregrado). ESPAM MFL. Calceta- Manabí.

- Gordillo, A. 2015. Superovulación en vacas criollas: relación de folículos preovulatorios, cuerpos lúteos y producción de embriones. (Tesis de pregrado) Universidad de Cuenca.
- Goulding, D., Baguisl, A., Boland, P., y Roche, F. 1993. Induced ovulation of the first postpartum dominant follicle in beef suckler cows using a GnRH analogue. *J. Reprod. Fertil.*, 99, 551.
- Grispon R. y Rey R. 2011. New perspectives in the diagnosis of pediatric male hypogonadism: the importance of AMH as a Sertoli cell marker. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia y Metabologia*. 55:8.
- Guerreiro, B., Batista, L., Vieira, F., Sá Filho, C., Rodrigues, A., Castro, Ne., Silveira, B., Bayeux, E., Dias, F., Monteiro, M., Accorsi, R., Lopes, P., Baruselli. 2014. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domest. Anim. Endocrin.* 49:96–104.
- Hadlow, N., Longhurst, K., McClements, A., Natalwala, J., Brown, S J., Matson PL. 2013. Variation in antimüllerian hormone concentration during the menstrual cycle may change the clinical classification of the ovarian response. *Fertil Steril.*; 99:1791-7.
- INEC-2017 (En línea). Consultado 10 oct. 2018. (PDF). Recuperado de http://app.sni.gov.ec/snlink/sni/Portal%20SNI%202014/FICHAS%20F/1310_PAJAN_MANABI.pdf
- Ireland, J., Ward, F., Jimenez-Krassel, J., Ireland, G., Smith, P., Lonergan, A. y 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-Krassel, F., Scheetz, L., Neuder, J., Ireland, J., Pursley, G., Smith, R., Tempelman, T., Ferris, W., Roudebush, y F, Mossa. 2015. Concentration of antiMüllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. *J. Dairy Sci.* 98(5):3036-3045.
- 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.
- Kawamata, M. 1994. Relationships between the number of small follicles prior to superovulatory treatment and superovulatory response in Holstein cows. *J Vet. Med. Sci.*, 56, 965–967.

- Larson, J., 2014. Determination of anti-Mullerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. *Dom Anim End.* Vol 46. P 58-64.
- Lozano-Domínguez, R., Asprón, C., Vásquez, E., González, C. y Aréchiga, F. 2010. Efecto del estrés calórico sobre la producción embrionaria en vacas superovuladas y la tasa de gestación en receptoras. *Rev. Mex. Cienc. Pec.* 1:189-203.
- Lucy, M., Savio, J., Badinga, L., de la Sota, L., y Thatcher, W. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci*, 70, 3615.
- Martins, C., Marques, M., Silva, R., Baruselli, P., 2005. Adequação do protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus*. [Tesis de Maestría]. Sao Paulo: Universidade de Sao Paulo.
- Monniaux, D., Rico, H., Larroque, R., Dalbiès-Tran,, Médigue, F., Clément, S. y Fabre. 2010. Anti-Müllerian hormone, an endocrine predictor of the response to ovarian stimulation in the bovine species. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 38(7-8):465-470.
- Moreno D. 2004. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone., *Theriogenology*. Pp 408.
- Mossa, F., Carter, F., Walsh, W., Kenny, D., Smith, G., Ireland, L., Hildebrandt, T., Lonergan, P., Ireland, J y Evans A, 2013. Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. *Biol Reprod.* 88(92): 1-9.
- Mossa, F. 2014. La hormona antimülleriana como indicadora de la capacidad reproductiva en la vaca. (HTML). Consultado, 8 de oct. 2017. 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>
- Mossa, F. e Ireland, J. 2018. Anti-Müllerian Hormone (AMH). Elsevier. *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*. 2: 222-226.
- Orellana, J. y Peralta E. 2007. Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and Sexing Technologies, Zamorano, Honduras.
- Peña C y Correa C. 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.
- Reyes, P. (2010). Superovulación y transferencia de embriones en bovinos, Tesis (PRE GRADO), Universidad Michoacan a de San Nicolás de

- Hidalgo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Michoacan, México.
- Ribeiro, E., Cerri, R., Bisinotto, R., Lima, F., Greco, L., Morrison, A., Kumar, A., Thatcher, W y Santos, J. 2013. Associations between plasma anti-Müllerian hormone (AMH) and fertility responses of seasonally calving grazing dairy cows. ADSA annual meeting.
- Ribeiro, E., Bisinotto, R., Lima, F., Greco, L., Morrison, A., Kumar, A., Thatcher, W., Santos, J. 2014. Plasma anti-Mullerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. American Dairy Science Association. 97:6888-6900
- Ricardez, M. 2015. Efectos de la hormona antimülleriana (AMH) en bovinos. Tesis (pre grado), Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro, Mexico.
- Rodríguez, M. 2011. Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino. (HTML) Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. [http:// www.porquebiotecnología. com.ar/](http://www.porquebiotecnología.com.ar/)
- Rojas, P., Recabarren P., Palma, S., Maliqueo, M., Carrasco, A., Sir-Petermann T. y Recabarren SE. 2014. Morfometría ovárica y expresión del ARN mensajero de hormona antimülleriana (AMH), receptor de FSH (FSHR) y factor nuclear kappa B (NFkB) en folículos en crecimiento de borregas expuestas prenatalmente a testosterona. Archivos de Medicina Veterinaria. 46:13-21.
- Salinas, B. 2011. Protocolos de superovulación para transferencia de embriones en bovinos. Tesis. Med. Veterinaria. Universidad de Cuenca. Cuenca, EC. p 128.
- Salinas, B. 2013. Efecto de la aplicación de gonadotrofina coriónica equina (eCG) en vacas donantes superovuladas con Folltropin-v (FSH-p liofilizada). Tesis. Mg. Sc. en Reproducción Animal. Universidad de Cuenca. Azuay, EC. p 27-47.
- Sirois, J. y Fortune J.E. 1988. Ovarian follicular dynamics during the oestrus cycle in heifers monitored by real time ultrasonography. Biology of Reproduction. 39: 308-317.
- Souza, A., Carvalho, P., Rosner, A., Vieira, L., Hackbart, K., Bender, R., Dresch A., Verstegen, J., Shaver R. y Wiltbank M. 2015. Relationship between circulating anti-Mullerian hormone (HAM) and superovulatory response of high-producing dairy cows. Journal of Dairy Science. 98:169-178.
- Sunderland, S., Crowe, M., Boland, M., Roche, F., Ireland, J. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. J. Reprod. Fertil., 101:, 547-555.
- Stringfellow, D y Seidel, G. 1990. Manual of the International Embryo Trasfer Society. 2nd. Ed: IETS .19.

- Ulloa, A., Falcón, J., Marsai, E., Rivas, R., Cedillo, L y Godoy H. 2012. Hormona antimülleriana como marcador de respuesta ovárica en fertilización in vitro. *Ginecol Obstet Mex*; 80(1): 1-7.
- Unger, S., Beraja, H. 2010. Hormona antimülleriana. Reserva ovárica y reserva testicular. *Reproducción* 25: 137-53
- Vales, C. 2016. Relación entre las concentraciones de hormona antimülleriana y el número de embriones transferibles en hembras bovinas. (PDF). Recuperado de <http://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/752/VALES%2C%20CARLA%20ESTEFANIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Vallejo, A. 2011. Biotecnologías reproductivas aplicadas a la mejora genética animal. Transferencia de embriones. Repartido de curso Técnicas Reproductivas. Facultad de Agronomía. UDELAR. p 98.
- Vieira, L., Rodrigues, M., Mendanha, M., Sá Filho, J., Sales, A., Souza, J., Santos, y P. S. Baruselli. 2014. Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. *Theriogenology* 82(2):204-212.
- Zanenga, C., Marques, M., Santos, I., Valentin, R., Baruselli, P., 2003. Comparacao entre dois protocolos de superovulacao com inseminacao artificial em tempo fixo em vacas Nelore (*Bos indicus*). In: XVII Reuniao anual da sociedade brasileira de tecnologia de embrioes;, Fortaleza, Brasil. *Acta Sci Vet*;
- Webb, R., Garnsworthy, P., Gong, J y Armstrong, D. 2004. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*. 82 E-Suppl. E63-74. 10.2527/2004.8213_supplE63x.

ANEXOS

ANEXO 1. Prueba de T para la variable total de recuento folicular

Statistix 8.0

14:21:39

18/10/2018,

Paired T Test for ALTA - BAJA

Null Hypothesis: difference = 0
 Alternative Hyp: difference <> 0

Mean	40.000
Std Error	6.2690
Mean - H0	40.000
Lower 95% CI	22.595
Upper 95% CI	57.405
T	6.38
DF	4
P	0.0031

ANEXO 2. Prueba de T para la variable total de cuerpos lúteos

Statistix 8.0

14:30:19

18/10/2018,

Paired T Test for ALTA - BAJA

Null Hypothesis: difference = 0
 Alternative Hyp: difference <> 0

Mean	-2.0000
Std Error	4.2661
Mean - H0	-2.0000
Lower 95% CI	-13.845
Upper 95% CI	9.8447
T	-0.47
DF	4
P	0.6636

ANEXO 3. Prueba de T para la variable total de folículos anovulatorios.

Statistix 8.0

14:31:46

18/10/2018,

Paired T Test for ALTA - BAJA

Null Hypothesis: difference = 0
 Alternative Hyp: difference <> 0

Mean	-0.6000
Std Error	2.8740
Mean - H0	-0.6000
Lower 95% CI	-8.5796
Upper 95% CI	7.3796
T	-0.21
DF	4
P	0.8448

Cases Included 5 Missing Cases 0

ANEXO 4. Prueba de T para la variable total de estructuras ováricas

Paired T Test for alta - baja

Null Hypothesis: difference = 0
 Alternative Hyp: difference <> 0

Mean	2.8000
Std Error	3.2156
Mean - H0	2.8000
Lower 95% CI	-6.1279
Upper 95% CI	11.728
T	0.87
DF	4
P	0.4330

Cases Included 5 Missing Cases 0

ANEXO 5. Prueba de T para la variable total de embriones.

Statistix 8.0

14:13:47

18/10/2018,

Paired T Test for alta - baja

Null Hypothesis: difference = 0
 Alternative Hyp: difference <> 0

Mean	-0.4000
Std Error	0.6782
Mean - H0	-0.4000
Lower 95% CI	-2.2831
Upper 95% CI	1.4831
T	-0.59
DF	4
P	0.5870

Cases Included 5 Missing Cases 0

ANEXO 6. Prueba de T para la variable total de embriones degenerados.

Statistix 8.0

14:16:42

18/10/2018,

Paired T Test for ALTA - BAJA

Null Hypothesis: difference = 0
 Alternative Hyp: difference <> 0

Mean	0.4000
Std Error	1.3266
Mean - H0	0.4000
Lower 95% CI	-3.2834
Upper 95% CI	4.0834
T	0.30
DF	4
P	0.7780

Cases Included 5 Missing Cases 0

ANEXO 7. Prueba de T para la variable total de ovocitos infertilizados.

Statistix 8.0

14:18:19

18/10/2018,

Paired T Test for ALTA - BAJA

Null Hypothesis: difference = 0
 Alternative Hyp: difference <> 0

Mean	2.8000
Std Error	2.9394
Mean - H0	2.8000
Lower 95% CI	-5.3610
Upper 95% CI	10.961
T	0.95
DF	4
P	0.3947

Cases Included 5 Missing Cases 0

ANEXO 8. Prueba de T para el total de embriones en vacas y vaquillas.

Null Hypothesis: difference = 0
 Alternative Hyp: difference < 0

Mean	0,6000
Std Error	1,2884
Mean - H0	0,6000
Upper 95% CI	4,1772
T	0,47
DF	4
P	0,6672

Cases Included 5 Missing Cases 0

ANEXO 9. Hormonas utilizadas para la sincronización de celos en las donadoras



ANEXO 11. Sincronización de celos



ANEXO 10. Hormonas utilizadas en el protocolo de superovulación



ANEXO 12. Aplicación de hormonas para el protocolo de superovulación



ANEXO 13. Inseminación de donadoras.



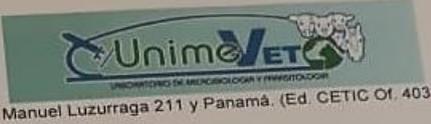
ANEXO 14. Colecta de embriones.



ANEXO 15. Conteo de cuerpos lúteos a través de ultrasonografía



ANEXO 16. Resultados de la prueba de ELISA para determinación de niveles de AMH por cada donante.



No. A057-2018 al 076-2018

SOLICITADO POR: Dr. Jorge Ignacio Macias Andrade FECHA: 26/01/2018

Fecha de recepción de muestras: 15/01/2018

Tipo de muestras: SUERO BOVINO

Diagnóstico de: ANTI-MULLERIAN HORMONE (AMH) BOVINE

Resultados:

Cod. Interno	Cod. Remitente	Cod. EIA	Average ODvalue	pg/ml	ng/ml	Cualitativo
				167,5	0,16753247	normal
57	Vaca 01	1501-01	0,129	228,6	0,22857143	normal
58	Vaca 02	1501-02	0,176	145,5	0,14545455	normal
59	vaca 03	1501-03	0,112	246,8	0,24675325	normal
60	vaca 04	1501-04	0,19	271,4	0,27142857	normal
61	vaca 05	1501-05	0,209	251,9	0,25194805	normal
62	vaca 06	1501-06	0,194	307,8	0,30779221	normal
63	vaca 07	1501-07	0,237	687,0	0,68701299	aito
64	vaca 08	1501-08	0,529	257,1	0,25714286	normal
65	vaca 09	1501-09	0,198	177,9	0,17792208	normal
66	vaca 10	1501-10	0,137	353,2	0,35324675	normal
67	vaca 11	1501-11	0,272	175,3	0,17532468	normal
68	vaca 12	1501-12	0,135	271,4	0,27142857	normal
69	vacona 14-01	1501-13	0,209	251,9	0,25194805	normal
70	.vacona 13	1501-14	0,194	340,3	0,34025974	normal
71	vacona 170-09	1501-15	0,262	215,6	0,21558442	normal
72	vacona 12-01	1501-16	0,166	207,8	0,20779221	normal
73	vaca cacho derretido	1501-17	0,16	185,7	0,18571429	normal
74	vacona 10-01	1501-18	0,143	235,1	0,23506494	normal
75	vaca 719	1501-19	0,181	197,4	0,1974026	normal
76	vacona s/n brahman	1501-20	0,152			

Valores de referencia:

0-100 pg/mL = bajo
100-400 pg/mL = normal
400+ pg/mL = alto

ANEXO 17-A. Embriones bovinos: estadios de desarrollo y calidad 1 - 5



Fuente: (Stringfellow y Seidel, 1990) (IETS)

ANEXO 17-B. Embriones bovinos: estadios de desarrollo y calidad 5 -9



Fuente: (Stringfellow y Seidel, 1990) (IETS)

ANEXO 18-A. Protocolo de superovulación para donadoras (Vaquillas).

Día	Fecha	Hora	Tratamiento	PLUSET	Observación
0	Miércoles 21-3-18	6:00hs	D.I.B 0,5 gr+2,5mg BE+ 50 mg P4		
4	Domingo 25-3-18	6:00hs	FSH 50UI	1ml	
		18:00hs	FSH 50UI	1ml	
5	Lunes 26-3-18	6:00hs	FSH 25UI	0,5 ml	
		18:00hs	FSH 25UI	0,5 ml	
6	Martes 27-3-18	6:00hs	FSH 25UI	0,5 ml	
		18:00hs	FSH 25UI	0,5 ml	
7	Miércoles 28-3-18	6:00hs	FSH 25UI	PGF 2ml	0,5 ml
		18:00hs	FSH 25UI	RETIRO D.I.B, PGF-2ml	0,5 ml
8	Jueves 29-3-18	6:00hs			
		18:00hs			
9	Viernes 30-3-18	6:00hs	GnRH 100 µg gonadorelin 2ml		
			I.A		
10	Sábado 31-3-18	6:00hs	I.A		
16	Viernes 6-04-18		Colecta de embriones		

ANEXO 18-B. Protocolo de superovulación para donadoras (Vacas)

Día	Fecha	Hora	Tratamiento	PLUSET	observación
0	Jueves 22-3-18	6:00hs	D.I.B 1 gr+2,5mg BE+ 50 mg P4		
4	Lunes 26-3-18	6:00hs	FSH 75UI	1,5ml	
		18:00hs	FSH 75UI	1,5ml	
5	Martes 27-3-18	6:00hs	FSH 50UI	1ml	
		18:00hs	FSH 50UI	1ml	
6	Miércoles 28-3-18	6:00hs	FSH 25UI	0,5ml	
		18:00hs	FSH 25UI	0,5ml	
7	Jueves 29-3-18	6:00hs	FSH 25UI	PGF 2ml	0,5ml
		18:00hs	FSH 25UI	RETIRO D.I.B, PGF 2ml	0,5ml
8	Viernes 30-03-18	6:00hs			
		18:00hs			
9	Sábado 31-03-18	6:00hs	GnRH 100 µg gonadorelin 2ml		
			I.A		
10	Domingo 01-04-18	6:00hs	I.A		
16	Sábado 07-04-18		Colecta de embriones		

ANEXO 18. Tabla general de datos.

DONADORAS	AMH	G	EO	TE	ED	OI	TRF	CL	FA
3	145.5	1	8	2	1	5	59	7	4
1	167.5	1	7	0	5	2	24	8	4
12	175.3	1	10	1	0	9	72	14	1
6	251.9	1	10	3	0	7	46	11	7
13	251.9	1	15	2	0	13	48	12	5
9	257.1	2	10	1	0	9	71	9	5
14	271.4	2	7	0	2	5	66	11	0
7	307.8	2	11	0	5	6	115	1	11
11	353.2	2	25	5	0	20	82	20	2
8	687.0	2	11	0	1	10	102	1	0