

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL**



**“RELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE LA HORMONA  
ANTIMULLERIANA CON DESARROLLO FOLICULAR,  
RESPUESTA SUPEROVULATORIA Y PORCENTAJE DE  
EMBRIONES VIABLES EN BOVINOS”**

**Presentada por:**

**JORGE IGNACIO MACIAS ANDRADE**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR  
*DOCTORIS PHILOSOPHIAE* EN CIENCIA ANIMAL**

**Lima - Perú**

**2020**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL**

**“RELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE LA HORMONA  
ANTIMULLERIANA CON DESARROLLO FOLICULAR,  
RESPUESTA SUPEROVULATORIA Y PORCENTAJE DE  
EMBRIONES VIABLES EN BOVINOS”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR  
*DOCTORIS PHILOSOPHIAE* EN CIENCIA ANIMAL**

**Presentada por:**

**JORGE IGNACIO MACIAS ANDRADE**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Dr. Edwin Mellisho Salas  
**PRESIDENTE**

Ph. D. William Vivanco Mackie  
**ASESOR**

Ph.D. Gustavo Gutierrez Reynoso  
**MIEMBRO**

Dra. María Elena Villanueva Espinoza  
**MIEMBRO**

Dr. Manuel Rosemberg Barrón  
**MIEMBRO EXTERNO**

## **DEDICATORIA**

A mi esposa Jessica Mesias Pino, por ser mi amiga, mi compañera, por formar parte de mi vida, por todo el amor que siempre me ha dado, y por ese apoyo que siempre me supo manifestar.

A mis hijas Ana Cristina y Hannah Valentina Macias Mesias, los regalos que Dios me dio, mi razón de vida, por sacarme siempre una sonrisa, alegrarme los días, y por todo el amor que siempre me han brindado.

A mis padres, Fabián Macias Andrade e Inés Andrade Zambrano, quienes supieron siempre enseñarme valores y guiarme en mi formación personal.

A mis hermanas, Priscilla Macias Andrade y Edison Macias Andrade por todo el cariño que siempre me han ofrecido

Jorge Ignacio Macias Andrade

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por darme la vida, la sabiduría y la fortaleza para seguir adelante, y vencer las dificultades que se presentaron.

A mi esposa y mis dos hijas por ser el eje y guía de mi vida, por su apoyo absoluto para cumplir con esta nueva meta.

A mis padres y mis hermanos por ser bases esenciales en mi vida, y el respaldo incondicional que me permitió cumplir con este objetivo.

A la Universidad Nacional Agraria La Molina que me abrió las puertas, como también al selecto grupo de profesores que forman parte del programa doctoral quienes brindaron las facilidades para llegar culminar con éxitos el programa de Doctorado en Ciencia Animal.

A mi profesor asesor, el Ph.D. Henry William Vivanco Makie, por su gran aporte y colaboración para el desarrollo de la investigación.

Al Ph. D. Ernesto Antonio Hurtado, por su gran contribución en el desarrollo de la investigación.

Jorge Ignacio Macias Andrade

# ÍNDICE GENERAL

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1	Ovogénesis y foliculogénesis.....	4
2.1.1	Conteo folicular antral.....	7
2.2	Factores intraováricos.....	8
2.2.1	Hormona antimülleriana.....	8
2.2.2	Estudios de hormona antimülleriana en la especie bovina.....	10
2.2.3	Estudios de hormona antimülleriana y fertilidad.....	10
2.3	Regulación hormonal de la reproducción.....	11
2.3.1	Hormona liberadora de gonadotropina.....	12
2.3.2	Hormona folículo estimulante.....	12
2.3.3	Hormona Luteinizante.....	13
2.3.4	Estrógenos.....	13
2.3.5	Progesterona.....	14
2.3.6	Prostaglandina F2 $\alpha$ .....	14
2.3.7	Inhibina.....	14
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1	Ubicación.....	16
3.2	Ensayo 1.....	16
3.2.1	Animales y manejo del ensayo inicial.....	17
3.2.2	VARIABLES ESTUDIADAS.....	17
3.2.3	Análisis estadístico.....	19
3.3	Ensayo 2.....	20
3.3.1	Animales y manejo del ensayo final.....	21
3.3.2	VARIABLES ESTUDIADAS.....	22
3.3.3	Análisis estadístico.....	24
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>26</b>
4.1	Relación de los niveles plasmáticos de AMH y el desarrollo folicular.....	26
4.2	Relación entre niveles de la hormona antimülleriana y número de folículos.....	28

4.3	Relación entre edad de las hembras y los niveles circulantes de AMH en hembras Brahman.....	31
4.4	Relación entre edad de las hembras Brahman y número de folículos antrales.....	33
4.5	Tamaño de ovarios y cuerpos lúteos.....	37
4.6	Relación entre niveles circulantes de AMH y la respuesta superovulatoria en hembras Brahman.....	39
4.7	Relación entre los niveles circulantes de AMH y la cantidad y proporción de embriones viables.....	41
4.8	Niveles de concentración circulante de AMH para la selección de hembras Brahman donantes de embriones.....	47
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXO.....</b>	<b>65</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Comparación de los diferentes niveles de la hormona antimülleriana en relación al número de folículos, tamaño de cuerpo lúteo y tamaño de ovarios en Brahman.....	27
<b>Tabla 2.</b>	Coefficientes de correlación de variables asociadas a la respuesta súper ovulatoria y la transferencia embrionaria en hembras Brahman.....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Relación entre niveles de la hormona antimülleriana en hembras Brahman (n = 60) y el número de folículos pequeños (A), grandes (B) y totales (C). .....	29
<b>Figura 2.</b>	Relación entre la edad de hembras Brahmán y los niveles plasmáticos de la hormona antimülleriana.....	32
<b>Figura 3.</b>	Relación entre la edad de hembras Brahman (n = 60) y el número de folículos pequeños (A), grandes (B) y totales (C).	36
<b>Figura 4.</b>	Relación entre tamaño de ovarios de hembras Brahman (n = 60) y número de folículos pequeños (A), grandes (B) y totales (C).....	38
<b>Figura 5.</b>	Relación entre los niveles de la hormona antimülleriana y el número de estructuras ováricas en Brahman (n = 21).....	41
<b>Figura 6.</b>	Relación entre los niveles de la hormona antimülleriana (n = 21) y el número de embriones viables en Brahman.	42

## ÍNDICE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b>	Resumen descriptivo de las variables niveles de hormona antimülleriana ( $\mu\text{g/ml}$ ), número de folículos, tamaño del cuerpo lúteo (mm) y tamaño de ovarios (cm) de hembras bovinas raza Brahman...	65
<b>Anexo 2</b>	Resumen del análisis de varianza para las variables número de folículos; tamaño del cuerpo lúteo (mm) y tamaño de ovarios (cm), para la dinámica folicular de hembras bovinas raza Brahman.....	65
<b>Anexo 3</b>	Resumen descriptivo de las variables niveles de hormona antimülleriana ( $\mu\text{g/ml}$ ), número de estructuras embrionarias, número de embriones viables, degenerados e infertilizados, número de cuerpos lúteos, folículos anovulatorios, estructuras ováricas y tasa de recuperación de embriones en hembras de raza Brahman.....	66
<b>Anexo 4</b>	Resumen del análisis de varianza para las variables cuerpos lúteos, folículos anovulatorios y estructuras ováricas en hembras Brahman...	66
<b>Anexo 5</b>	Resumen del análisis de varianza para las variables estructuras embrionarias, embriones viables, degenerados e Infertilizados, y tasa de recuperación embriones en la raza Brahman.....	67
<b>Anexo 6</b>	Protocolo de superovulación para donantes (Vaquillas).....	67
<b>Anexo 7</b>	Protocolo de superovulación para donadoras (Vacas).....	68
<b>Anexo 8</b>	Embriones bovinos: desarrollo embrionario y calidad 1 – 5.....	69
<b>Anexo 9</b>	Embriones bovinos: desarrollo embrionario y calidad 5 -9.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS.

AMH	Hormona antimülleriana
MOET	Superovulación y transferencia embrionaria
FSH	Hormona folículo estimulante
LH	Hormona Luteinizante
AFC	Conteo de folículos antrales
GnRH	Hormona liberadora gonadotropinas
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
GDF-9	Factor de crecimiento y diferenciación 9
BMP-15	Proteína morfogénica de hueso 15
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
KL	Ligando Kit
BMP-4	Proteína morfogénica de hueso 4
BMP-7	Proteína morfogénica de hueso 7
ACTH	Hormona adenocorticotrópica
hMG	Gonadotropina menopáusica humana
E2	Estrogeno
P4	Progesterona
PGF-2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
C.C	Condición corporal
pg	Picogramos
PBS	Solución Buffer de fosfato

## RESUMEN

La hormona antimülleriana (AMH) es secretada en las células de la granulosa de folículos pre antrales y antrales pequeños, se ha propuesto como marcador hormonal para estimar la reserva folicular ovárica. Con el fin de determinar la relación del nivel de AMH sobre la dinámica folicular, la respuesta superovulatoria y porcentaje de embriones viables. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con arreglo factorial, el factor A correspondió a la categoría del animal vaquillas entre 24 y 30 meses (n=30), y vacas con más de 3 años de edad (n=30) y el factor B correspondió a los niveles de la hormona antimülleriana <200; 200-300  $\mu\text{g/ml}$  y >300  $\mu\text{g/ml}$ . El análisis de regresión entre los niveles AMH con el número de folículos pequeños, grandes y total de folículos ( $p<0,05$ ); resultando ajustes cuadráticos para folículos pequeños ( $R^2=0,66$ ), folículos grandes ( $R^2=0,51$ ) y total de folículos ( $R^2=0,67$ ). Los valores promedios obtenidos muestran que en los rangos 200-300 y 300-450 ( $\mu\text{g/ml}$ ) ocurren los mayores valores de estructuras ováricas ( $p<0,05$ ). Con respecto a embriones viables se alcanzaron los mayores promedios en los niveles comprendidos 300- 450 ( $\mu\text{g/ml}$ ). Los niveles plasmáticos de AMH y la respuesta superovulatoria ( $p<0,05$ ), presentaron ajuste lineal positiva ( $R^2=0,73$ ). El número de embriones viables también presentaron ajuste lineal ( $R^2=0,73$ ). Se concluye que la población folicular antral, número de estructuras ováricas y número de embriones viables, es mayor a medida que aumentan los niveles de AMH. Y que la edad tiene un ajuste lineal inverso con relación al nivel plasmático de AMH

Palabras Clave: AMH, AFC, ultrasonido, bovinos

## ABSTRACT

The antimüllerian hormone (AMH) is secreted in the granular cells of pre-antral and small antral follicles, it has been proposed as a hormonal marker to estimate ovarian follicular reserve. In order to determine the relationship of the AMH level on follicular dynamics, the superovulatory response and percentage of viable embryos. A completely randomized experimental design with factorial arrangement was used, factor A corresponded to the category of animal heifers between 24 and 30 months ( $n = 30$ ), and cows with more than 3 years of age ( $n = 30$ ) and factor B corresponded to antimüllerian hormone levels  $<200$ ;  $200-300 \text{ } \mu\text{g / ml}$  and  $> 300 \text{ } \mu\text{g / ml}$ . Regression analysis between AMH levels with the number of small, large follicles and total follicles ( $p < 0.05$ ); resulting in quadratic adjustments for small follicles ( $R^2 = 0.66$ ), large follicles ( $R^2 = 0.51$ ) and total follicles ( $R^2 = 0.67$ ). The average values obtained show that in the ranges  $200-300$  and  $300-450 \text{ } (\mu\text{g / ml})$  the highest values of ovarian structures occur ( $p < 0.05$ ). With respect to viable embryos, the highest averages were reached at levels between  $300-450 \text{ } (\mu\text{g / ml})$ . The plasma levels of AMH and the superovulatory response ( $p < 0.05$ ) presented positive linear adjustment ( $R^2 = 0.73$ ). The number of viable embryos also presented linear adjustment ( $R^2 = 0.73$ ). It is concluded that the antral follicular population, number of ovarian structures and number of viable embryos, is greater as AMH levels increase. And that age has an inverse linear adjustment in relation to the plasma level of AMH

Keywords: AMH, AFC, ultrasound, cattle

## I. INTRODUCCIÓN

La transferencia embrionaria es un método reproductivo de gran impacto en la productividad y en la calidad del producto obtenido en la producción animal por su influencia en la presión y precisión de la selección, la variabilidad genética y el intervalo generacional que son los factores que determinan la tasa de progreso genético. El uso de la transferencia embrionaria en la reproducción bovina como instrumento de diseminación de los genes de animales selectos data desde hace más de 50 años (Bó y Mapletoft 2003), sin embargo, su difusión como método reproductivo no ha sido tan rápida sobre todo cuando la producción embrionaria se hace vía superovulación (método *in vivo* o *MOET*) debido principalmente a la gran variabilidad en las respuestas en términos de embriones transferibles obtenidos por sesión o ronda superovulatoria, resultando muchas veces en ausencia de representación con crías elevando el costo de generación de las crías.

Entre los factores que determinan la proporción de embriones transferibles por ronda superovulatoria, los más importantes son el número de ovulaciones obtenidas, la tasa de fertilización de los ovocitos ovulados y la proporción de embriones (ovocitos fecundados) que desarrollan hasta el estadio adecuado para su transferencia. Contar con un método confiable para poder predecir el rendimiento en embriones transferibles de las vacas donadoras de embriones, ha sido un objetivo muy ansiado en la industria de la producción embrionaria por muchos años. Es conocido que sólo los folículos antrales son capaces de responder a la acción estimuladora de las gonadotropinas desarrollando hasta su maduración y ovulación bajo la acción coordinada de la hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH).

La reserva ovárica de un animal es la cantidad o pool de folículos en el ovario que tiene para su vida reproductiva. Evaluar esta reserva ofrece información muy importante sobre la capacidad reproductiva animal y se puede estimar por medio de recuento folicular por ecografía y/o la determinación de la Hormona Antimülleriana (AMH). Esta hormona fue empleada en reproducción humana como marcador de la reserva ovárica y su concentración se asocia con el número de folículos antrales (de Vet *et al.* 2002) y es considerada por

Fanchin *et al.* (2003) como un indicador del estado funcional del ovario mejor que otros marcadores como la inhibina B, FSH, LH y estradiol. Monniaux (2012) manifiesta que la AMH está relacionada con la población folicular ovárica y la fertilidad.

En bovinos la AMH ha sido propuesta como predictor del número de folículos antrales (Batista *et al.* 2014) y de la producción de embriones (Rico *et al.* 2011), estos autores concuerdan la AMH se asocia positivamente con la población de folículos antrales, es por estos antecedentes que se plantea a la AMH como un importante marcador hormonal para ser utilizado en conjunto con las biotecnologías reproductivas (Baruselli *et al.* 2015).

Larson (2014), demostró que en las células de Sertoli en los machos y en las células de la granulosa en las hembras es el sitio donde se sintetiza y secreta AMH y por la implicación que tiene en estas células se plantea como un excelente marcador sobre el potencial reproductivo en bovinos y otras especies, ya que estudios manifiestan que esta glicoproteína tiene poca variación durante los diferentes ciclos reproductivos.

El potencial que tiene una vaca para producir ovocitos, la sobrevivencia de sus embriones y fetal son los más importantes factores que establecen su potencial reproductivo, ya que de esto la tasa de natalidad. Por esto el desarrollo de nuevas tecnologías para el diagnóstico que determinen o predigan la fertilidad de la vaca, será un gran avance para el sector ganadero (Mossa *et al.* 2013).

Batista *et al.* (2014) compararon los niveles circulantes de AMH entre *Bos taurus* y *Bos indicus* y reportan diferencias entre los niveles circulantes entre estas especies pero no se indican cuáles serían los niveles de AMH relacionados con adecuada respuesta superovulatoria y fertilidad en el *Bos indicus*. En la costa del Ecuador la ganadería está basada principalmente en la crianza y explotación de razas y cruces con *Bos indicus*, siendo la raza predominante para la producción de carne la raza Brahman; es de mucho interés el uso de la superovulación y transferencia embrionaria en esta raza con fines de mejora genética por lo que la utilización de los niveles circulantes de AMH para la selección de donantes de embriones para superovulación es de mucha importancia, planteándose por lo tanto como objetivo general de la presente investigación determinar la relación del nivel sérico de hormona antimülleriana sobre el desarrollo folicular, respuesta súper ovulatoria y proporción de embriones viables en hembras de la raza Brahman criadas en condiciones climáticas de la costa Ecuatoriana. Y como objetivos específicos: 1) Evaluar la relación

entre los niveles circulantes de AMH y el número de folículos que constituyen la población de folículos antrales y el tamaño de los folículos, el tamaño del ovario y el tamaño de los cuerpos lúteos formados post ovulación. 2) Establecer la relación entre la edad y los niveles circulantes de AMH en hembras Brahman. 3) Comprobar la relación entre la edad de la hembra y el número de folículos antrales en el ovario. 4) Verificar la relación entre los niveles circulantes de AMH y la respuesta superovulatoria en hembras Brahman. 5) Valorar la relación entre los niveles circulantes de AMH y la cantidad y proporción de embriones viables obtenidos por superovulación. 6) Determinar los niveles mínimos recomendables para obtener adecuada respuesta superovulatoria y tasa de embriones transferibles en hembras Brahman.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS

La ovogénesis es el proceso de formación y desarrollo del ovocito. Comienza con las ovogonias, que derivan de las células germinales primordiales en el embrión y culmina cuando el ovocito II finaliza su meiosis. Las células germinales primordiales se diferencian del epitelio del saco vitelino durante el desarrollo embrionario, migran a través del mesenterio y colonizan las gónadas primitivas del mesonefro (Gigli *et al.* 2006).

El desarrollo de los folículos primordiales ocurre cuando pasan de un estado de reposo a un estado de crecimiento que consta de dos fases: La primera ocurre un aumento del número de células y el cambio de su forma de células planas a cuboides, la segunda sobreviene el aumento en el diámetro del ovocito (Wezel & Rodgers 1996; Braw-Tal 2002).

Un folículo primordial consta de un ovocito cuyo crecimiento se ha detenido en el estado de diploteno de la profase I de la meiosis y está rodeado por una capa simple de células planas (pre granulosas) constituyendo la reserva de folículos en reposo (Nilsson *et al.* 2001).

Los miembros de la superfamilia de factores transformante son considerados probables promotores de la aceleración de folículos primordiales, ya que observa que un requisito para el inicio del crecimiento del ovocito es el cambio de células de la granulosa de planas a cúbicas (Braw-Tal 2002). El papel del oocito en la activación de los folículos primordiales está determinado por la acción de un gen llamado *figla*, que se encarga coordinar la expresión de genes que componen la zona pelúcida y la producción de uno o varios factores fundamentales para la formación de folículos primordiales (Eppig 2001).

En varias especies las etapas iniciales del crecimiento folicular avanzan muy lentamente. En contraste, con las etapas después de la formación del antro que son mucho más rápidas. La atresia folicular parece ser más abundante cuando los folículos se acercan al tamaño de reclutamiento para la posible ovulación (Fortune 1994)

La dinámica folicular es un proceso continuo que finaliza con la ovulación y consta de dos fases; la primera, conocida como “desarrollo folicular basal” la cual está principalmente bajo control paracrino de los factores de crecimiento. En esta fase la hormona folículo estimulante (FSH) puede ejercer un efecto mitogénico indirecto sobre las células de la granulosa por aumento en la expresión de los factores de crecimiento o de sus receptores. La segunda fase se conoce como “desarrollo folicular terminal” y depende estrictamente de las Gonadotropinas. El crecimiento es rápido y ocurre por agrandamiento del antro folicular debido a importantes cambios en la diferenciación de las células foliculares (Peña *et al.* 2007).

De acuerdo a Fortune (1994), la selección y dominancia ocurren por aumentos progresivos en el contenido sérico de andrógenos que llegan por los vasos sanguíneos de la médula y la capacidad de las células de la granulosa en aromatizar el andrógeno a estradiol y un aumento de la (LH). Durante la fase folicular parece ser necesario para estos cambios, aunque no está totalmente esclarecido los factores que participan en el proceso de crecimiento del folículo dominante; aunque se puede inducir la ovulación de este mediante la aplicación de un análogo de GnRH (Peña *et al.* 2007).

La función de las moléculas asociadas con la activación de los folículos primordiales en bovinos, explica la importancia de iniciar el crecimiento de este grupo de folículos en reposo y mantenerlo hasta una etapa en la que el ovocito madure y sea fecundado. De esta manera se evalúa la calidad de los folículos y sus ovocitos, los cuales son parte importante en la aplicación de las biotecnologías de la reproducción y de la conservación en especies en peligro de extinción y en mujeres infértiles (Fortune *et al.* 1998; Fortune 2003).

Por otra parte, Ireland (1987), indica que en la foliculogénesis, los folículos antrales son dependientes de las gonadotropinas, las que provocan desarrollo y maduración, pero muchos de estos folículos sufren atresia. El proceso para llegar a la supervivencia del folículo ovulatorio, se estima que está en dependencia a la sensibilidad de los folículos a las gonadotropinas.

En la yegua se presenta una foliculogénesis estacional y por este motivo puede presentar ovulaciones diestrales, el bovino es poliéstrico continuo sus ondas foliculares se observan durante todo el año incluso durante la preñez, puede presentar hasta tres ondas foliculares en

cada ciclo estral. Los camélidos sudamericanos también responden al modelo de ondas foliculares y son una especie de ovulación inducida (Gigli *et al.* 2006).

Segun Gigli *et al.* (2006), durante el ciclo estral, en cada una de las oleadas foliculares, inician su desarrollo alrededor de 5 a 20 folículos, los que van a reiniciar su meiosis después de una elevación secundaria de los niveles de FSH, y su un umbral de concentración que varía entre animales y folículos.

La emergencia de la segunda onda se presenta entre los días 9 y 10 en los ciclos estrales de dos ondas foliculares, y entre los días 8 y 9 para los de tres ondas. En los ciclos estrales que presentan tres ondas foliculares, la tercera onda folicular emerge entre los días 15 y 16. (Gigli *et al.* 2006).

Motta *et al.* (2011) reportaron que, durante cada oleada folicular, hay un grupo de folículos pequeños, medianos y grandes en cada gónada femenina, de estos uno será el ovulatorio, 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 (Pierson & Ginther 1987) 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 ( $\leq 5$  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, 1994). 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.* 1989).

En el ciclo estral del ganado Brahman pueden tener varias ondas foliculares, presentando la siguiente proporción (6,7%) una, dos (90,0%) o tres (3,3%), 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 (Pierson & Ginther 1987; revisado en Henao 2010).

En investigación realizada por Moreira *et al.* (2000), en la raza Gyr, encontraron ciclos estrales con dos, tres, cuatro y cinco ondas foliculares, (6,67%), (60,00%), (26,67%) (6,67%) respectivamente, la divergencia folicular de la primera onda folicular ocurrió en el día  $5,7 \pm 1,7$ , en la segunda onda en el día  $10,2 \pm 0,9$ , la tercera en el día  $14,7 \pm 0,9$  y la cuarta  $18,7 \pm 1,2$  días del ciclo estral.

Mientras que Perea *et al.* (1998), indicaron, que vacas cebú mestizas durante su primer ciclo estral después del parto, el 16,5% de ellas mostraron una onda folicular, el 67% dos ondas y 16,5% tres ondas foliculares.

Para Moreira *et al.* (2000), la primer onda folicular emerge en el día  $1,2 \pm 0,5$ , la segunda el día  $7,2 \pm 0,9$ , la tercera el día  $11,2 \pm 0,9$  y la cuarta el día  $15 \pm 1,4$  de cada ciclo estral, en ganado Gir. Mientras que Figueiredo *et al.* (1997), indica, el ganado Nelore presentan tres oleadas de desarrollo folicular, la primera el día  $1,5 \pm 0,2$ , la segunda el día  $9,1 \pm 0,4$ , y la tercera en el día  $15,1 \pm 0,4$  del ciclo estral.

### **2.1.1 CONTEO FOLICULAR ANTRAL.**

El Conteo folicular antral AFC desarrolló mucho interés desde la mejoría de la ecografía ovárica y la validación de nuevos marcadores endocrinos, con los equipos de ecografía actuales es posible evaluar el número de folículos antrales mayores de 1 mm de diámetro presentes en los ovarios de las mujeres y grandes especies domésticas o silvestres. En la actualidad, esta evaluación es una práctica rutinaria muy importante para estimar la actividad ovárica de las hembras. AFC ayuda a los médicos a diagnosticar la infertilidad femenina, y predecir la capacidad reproductiva (Monniaux *et al.* 2014).

En humanos y los grandes mamíferos, los folículos crecen lentamente después de la formación del antro, es en este estadio, cuando se convierten en gonadotropina dependiente y entran en una fase de rápido desarrollo terminal, que se producen en un patrón de onda (Fortune 1994).

La dependencia de los folículos a las gonadotropina se adquiere con un diámetro determinado, en cada especie (por ejemplo, 200  $\mu\text{m}$  en roedores, 1 mm en cerdos, 2 mm en ovejas, 3-5 mm en humanos y vacas, y alrededor de 10 mm en caballos). Por debajo de este

diámetro, los pequeños folículos antrales constituyen un conjunto de folículos que no responden a las gonadotropinas (Monniaux *et al.* 1997).

## **2.2 FACTORES INTRAOVÁRICOS.**

La activación, crecimiento inicial de los folículos primordiales y posterior desarrollo folicular están comandados por factores de crecimiento intraováricos de acción local no dependientes de gonadotropinas (Wezel & Rodgers 1996; Fortune 2003; Aerts & Bols 2008). Estos factores de crecimiento son polipéptidos producidos a partir de diversos tipos celulares y no se almacenan intracelularmente (Hill 1989). Estos factores de crecimiento realizan su trabajo de forma autocrina y paracrina, para lo que se requiere una comunicación entre el oocito y las células granulosas y entre cada una de las células granulosas (Eppig 2001). Estas células presentan conexiones *gap*, que permiten la comunicación entre las células, las células de la granulosa se comunican mediante estas uniones, que se encuentra constituida por proteínas conocidas como conexinas (Fair 2003).

Gracias a este sistema de comunicación bidireccional mediante la transferencia de señales locales y endocrinas que se establece con las células somáticas y el oocito, varias hormonas y factores de crecimiento estimulan y regulan el desarrollo de los folículos (Eppig 2001; Gilchrist *et al.* 2004; Skinner 2005).

Dos importantes factores secretados por oocitos, son el factor de diferenciación del crecimiento 9 y la proteína morfogenética ósea 15, que activan las vías de señalización en las células del cumulus. En las uniones *gap*, las conexinas forman un poro que permite el paso de moléculas desde el citoplasma de una célula al citoplasma de otra, sin pasar por el espacio extracelular. Esta forma de comunicación es vital en el desarrollo y fertilidad del oocito, debido que el oocito dirige la proliferación y función de células de la granulosa, mientras que estas se encargan de la nutrición y mantenimiento del oocito a través del paso de iones, metabolitos, aminoácidos y pequeñas moléculas necesarias para su crecimiento (Aerts & Bols 2008).

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF-9) y la proteína morfogénica de hueso 15 (BMP-15) se sintetizan de modo específico en el oocito en los estadios tempranos y participan en el crecimiento folicular hacia el estadio primario (Knight & Glister 2003).

Nilsson *et al.* (2001), manifestaron, que en cultivos de ovario neonatal de ratas, el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) en el desarrollo folicular temprano, que es expresado por el oocito de los folículos primordiales y primarios, controla la expresión del ligando Kit (KL) y origina el incremento de las células de la granulosa, las células tecales y el estroma durante el desarrollo de los folículos.

Los factores de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), son sintetizados en las células somáticas del ovario y el ovocitos; ellas tienen función como reguladores del desarrollo folicular intraovárico. Las proteínas morfogenéticas óseas, BMP-4 y BMP-7, se expresan en las células del estroma y de la teca y participan en la transición folicular primordial a primaria de manera positiva; en cambio con la AMH se evidencia un papel negativo, del cambio de célula pre-granulosa, a granulosa y posterior progresión a la etapa antral (Knight & Glister 2003).

### **2.2.1 HORMONA ANTIMÜLLERIANA**

La hormona Antimülleriana (AMH) es un miembro de la superfamilia del TGF- $\beta$  (Weenen 2004). La AMH se expresa en células de la granulosa y hasta ahora es considerada como el mejor marcador hormonal para la reserva folicular ovárica. De esta manera la AMH en la especie humana tiene su aplicación en diagnóstico clínico y en la mejora de las aplicaciones de biotecnologías (Shaw *et al.* 2011). También la AMH puede desempeñar un papel importante en la selección de folículos primordiales y en el crecimiento cíclico de los folículos (Carlsson 2006).

Broekmans *et al.* (2008); (Rico *et al.*, 2009) muestran que el nivel sérico de AMH se relaciona con el número de folículos ováricos, como también propone que la AMH tenga un rol importante en la selección de folículos dominantes. La AMH producida es producida principalmente por folículos preantrales y antrales, participa en el desarrollo del folículo. La AMH durante la foliculogénesis, en el reclutamiento inicial inhibe la transformación de folículos primordiales a folículos primarios, y en el reclutamiento cíclico causa inhibición de la sensibilidad a la hormona folículo estimulante (Monniaux *et al.* 2012).

En un estudio realizado en humanos, se evaluó la expresión de AMH mediante técnicas inmunohistoquímicas en secciones ováricas, con esto desarrollaron un nuevo anticuerpo monoclonal para AMH humano, la expresión de AMH no se observó en folículos primordiales, mientras que el 74% de los folículos primarios mostraron al menos una señal

débil en las células de la granulosa y el nivel más alto de expresión de AMH fue en las células de la granulosa de los folículos secundarios, preantrales y antrales  $\leq 4$  mm de diámetro, pero la expresión de AMH desapareció gradualmente en los folículos antrales entre 4 y 8 mm (Weenen *et al.* 2004).

### **2.2.2 ESTUDIOS DE HORMONA ANTIMULLERINA EN LA ESPECIE BOVINA**

Durlinger *et al.* (2002) describen, que varios estudios *in vivo* e *in vitro* muestran la participación de la AMH en dos puntos críticos de selección del desarrollo folicular: inhibe el reclutamiento de folículos primordiales en el grupo de folículos en crecimiento y también disminuye la capacidad de respuesta de los folículos en crecimiento a la FSH.

Jimenez-Krassel *et al.* (2015) reportan, que las concentraciones circulantes de AMH son un biomarcador confiable para predecir la vida productiva del rebaño, debido a la correlación positiva entre la hormona y el recuento de folículos antrales (AFC), la función ovárica y la fertilidad, además encontraron que aproximadamente el 25% de las vacas tienen una AFC relativamente baja y concentraciones bajas de AMH. Con esto concluyeron, que las vaquillas con concentraciones bajas de AMH muestran una baja tasa de fertilidad, lo que conlleva que se descarten a muy temprana edad, por lo que su tiempo vida útil es más corta, en comparación con vaquillas que tiene niveles séricos más altos de AMH.

Debido que los niveles de AMH son relativamente constantes durante los diferentes etapas reproductivas en novillas lecheras, es suficiente la determinación de la concentración de AMH por única vez, para predecir la longevidad del hato, y la AMH puede ser un marcador fenotípico útil para mejorar la longevidad de las vacas lecheras (Jiménez-Krassel *et al.* 2015).

### **2.2.3 ESTUDIOS DE HORMONA ANTIMÜLLERIANA Y FERTILIDAD**

En un estudio realizado por Jiménez-Krassel *et al.* (2015) comprobaron que las vaquillas con niveles séricos bajos de AMH tienen una fertilidad subóptima, y se eliminan de un rebaño por un rendimiento reproductivo bajo a un mayor ritmo, lo que determina que se descarten del hato mucho más rápido, comparadas con las hembras que muestran mayores niveles de AMH. Ellos llegaron a esta conclusión después evaluar novillas Holstein de 11 a 15 meses de edad ( $n = 281$ ) a las que se les realizó una sola medición de AMH. Todas las novillas no retiradas del rebaño tuvieron la oportunidad de completar 2 lactancias y comenzar su tercera lactancia después del parto. Los resultados mostraron que las novillas

con menor concentración de AMH, tuvieron en promedio, una vida productiva más corta (en 196 d), debido a una tasa de descarte más alta por la reproducción pobre (primera lactancia) en comparación con las hembras con mayor AMH.

Jimenez-Krassel *et al.* (2015); y Ribeiro *et al.* (2013), indican, que niveles séricos de AMH y la fertilidad en ganado lechero se encuentran muy correlacionados entre sí, de manera positiva. Ribeiro *et al.* (2014) indican en un estudio realizado en los Estados Unidos, en el estado de la Florida, vacas con bajos niveles séricos de AMH de primer servicio, presentaron tasas de preñez más bajas, y mayores pérdidas de preñez entre los días 30 y 65 de gestación. Al respecto Jimenez-Krassel *et al.* (2015) manifiestan, que en vacas de leche, con niveles séricos de AMH relativamente bajos, que fueron diagnosticados, a la edad de vaquillas, se descartaron del rebaño, mucho más rápido, en comparación con las que tenían mayores niveles circulantes de AMH.

### **2.3 REGULACIÓN HORMONAL DE LA REPRODUCCIÓN**

El control de la función reproductora requiere una regulación precisa, y temporal del eje hipotálamo, hipófisis, gónadas. El hipotálamo es un pequeño órgano del diencéfalo situado en el piso del tercer ventrículo, supraóptico y paraventricular se sintetizan las hormonas neurohipofisarias en los núcleos arqueado y ventromedial se liberan hormonas hipofisiotrópicas, como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), es el factor del cerebro que dirige el eje reproductivo Transportada a la adenohipófisis por el sistema portal hipotálamohipofisiario y estimula la síntesis de hormona luteinizante y folículo estimulante (Hafez 2000).

La hormona folículo estimulante, promueve el crecimiento folicular, los folículos pequeños secretan pequeñas cantidades de estrógenos lo que, unido a un nivel de progesterona, genera una retroalimentación negativa en el hipotálamo, provocando la secreción tónica de FSH y LH. En cambio cuando un folículo llega a ser folículo dominante, el incremento de los niveles circulantes de estrógenos, y una disminución de los niveles de progesterona, estimula el centro cíclico provocando la secreción del pico de LH, este pico desencadena la maduración final, ovulación y luteinización folicular (Ireland 1987).

Además, el folículo dominante secreta grandes cantidades de inhibina, quien tiene receptores en la adenohipófisis, al unirse a dichos receptores causa inhibición de la secreción de FSH, pero sobre la secreción de LH, lo que causa atresia de los folículos subordinados, los que no

desarrollaron receptores para LH, la ovulación marca la culminación de la fase folicular y el inicio de un nuevo ciclo estral y de una nueva fase lútea (Fortune 1994).

Mientras el cuerpo lúteo mantenga concentración sérica de progesterona elevada, y exista una concentración baja de estrógenos; se genera retroalimentación negativa lo que impide el pico de LH y con esto la ovulación. La luteolisis se produce por la secreción de PGF2 $\alpha$  del endometrio no gestante, provocando la disminución en los niveles sanguíneos de progesterona al mismo tiempo que se inicia un nuevo ciclo (Ireland 1987).

### **2.3.1 HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS (GNRH)**

La GnRH, la hormona adenocorticotrópica (ACTH) y el factor inhibidor de prolactina son parte de las hormonas primarias implicadas en el control de la reproducción, es un decapeptido formado por 10 aminoácidos, con un peso molecular de 1183 daltons (Hafez 2000).

Pursley *et al.* (1995) indican, que la GnRH es sintetizada y almacenada en el hipotálamo, y transportada 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).

### **2.3.2 HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH)**

La teca interna de los folículos antrales son sensibles a la FSH respondiendo con la activación de la enzima aromatasa en las células de la granulosa y transforma los andrógenos en estradiol bajo la influencia de la FSH, esto provoca que las células de la granulosa se multipliquen, incrementando las capas que rodean al ovocito I y aumentando el tamaño folicular (Voss & Mckinnom 1993).

Asimismo, la FSH en el estadio folicular temprano y la intermedio, estimula la formación de receptores para LH en las células de la granulosa, puesto que, en estas fases la FSH en asociación con la LH sostienen el desarrollo folicular (Erickson *et al.* 1976).

La FSH, junto con la LH estimulan la síntesis de estradiol de los folículos en desarrollo e inhibina en las células tecaes de folículos dominantes, esta inhibina realiza una retroalimentación negativa sobre la adenohipófisis suprimiendo la liberación de FSH, en la especie humana, después de la menopausia, los niveles circulantes de FSH aumenta notablemente por lo que atraviesa el filtrado glomerular y llega a la orina como gonadotropina menopáusica humana (hMG), y es utilizada como hormona para inducir la superovulación en humanos y animales (Peters *et al.* 2004).

### **2.3.3 HORMONA LUTEINIZANTE (LH)**

La LH, es una glucoproteína que se sintetiza y secreta en la adenohipófisis, y se acopla al mismo patrón de secreción de pulsos de la GnRH, su órgano blanco son las células de la teca de los folículos, cuerpo lúteo en la hembra, y células de sertoli en el macho donde estimula la síntesis y secreción de estrógeno, progesterona, y testosterona respectivamente (Ireland 2007).

También, la LH al estimular la síntesis y secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo, dispone al útero para la nutrición, desarrollo e implantación del embrión; disminuye el tono miometrial, y cierra el canal cervical. Otro punto importante es que el pico preovulatorio de LH causa la activación del ovocito y que se reanude la meiosis (Peters *et al.* 2004)

### **2.3.4 ESTRÓGENOS (E2)**

El E2 es una hormona esteroidal, su precursor metabólico es el colesterol. Los estrógenos son lípidos simples que se derivan del ciclopentanoperhidrofenantreno y por ello están muy relacionadas químicamente con los progestágenos, andrógenos y el cortisol (Booth & McDonald 1988). El  $17\beta$  estradiol es el principal estrógeno natural de las hembras mamíferas (Schoenemann *et al.* 1985).

El estrógeno regla una gran variedad de funciones fisiológicas, como el desarrollo sexual, ciclo sexual conducta sexual, actuando sobre el sistema nervioso central, por medio de una retroalimentación positiva y negativa sobre el hipotálamo, además causa hiperplasia e hipertrofia del endometrio, contracción uterina, desarrollo de caracteres sexuales secundarios, crecimiento de conductos y desarrollo de la glándula mamaria (Freeman 2006).

### **2.3.5 PROGESTERONA (P4)**

Erickson (1976), indica, que la P4 también es una de las más de las hormonas esferoidales, entre sus efectos está el mantenimiento de la preñez al inhibir las contracciones del miometrio, promueve del desarrollo de las glándulas endometriales, a nivel de las glándulas mamarias estimula el desarrollo alveolar, tiene acción sinérgicas con el estrógeno preparando el útero para la implantación y posterior placentación.

Los niveles circulantes altos de P4 impide la ovulación a través de una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo inhibiendo la secreción de GnRH, lo que genera un desarrollo incompleto de los folículos y de la secreción de estrógenos, la relación de concentración P4 y los estrógenos determinan el inicio y duración del ciclo estral (Carvalho 2008)

De igual forma, Carvalho (2008) indica, que el estrógeno es el responsable de las contracciones uterina en el momento del celo y la ovulación, esto ayuda al transporte espermático, contrario a los efectos por parte de la P4 que suprime las contracciones del miometrio para no perturbar la preñez, lo que muestra, como estas hormonas regulan la duración del ciclo estral.

### **2.3.6 PROSTAGLANDINA (PGF<sub>2</sub>A)**

Las PGF-2 $\alpha$  son derivados de ácidos grasos esenciales de 20 carbonos que contiene 3, 4 o 5 uniones dobles en la cadena lateral, producidas en la membrana fosfolipídica de las células por acción de diferentes enzimas como la fosfolipasa A2, cicloxigenasa, prostaglandina sintetasa, etc., regulador importante de la ovulación, luteólisis, implantación y parto, la PGF-2 $\alpha$  en los rumiantes, llega del endometrio al ovario por difusión de la vena uterina hacia la arteria ovárica, por ser liposoluble (Adams 2008).

Los primeros estudios mostraron que el cuerpo lúteo maduro, al momento de un tratamiento aplicando PGF-2 $\alpha$ , era sensible e inducía a lisis del cuerpo lúteo, pero que el cuerpo lúteo no era sensible a la PGF-2 $\alpha$  cuando se inyectaba en los primeros 5 a 6 días del ciclo estral (Macmillan & Henderson 1984).

### **3.3.7 INHIBINA**

Los niveles séricos de inhibina se elevan simultáneamente con desarrollo de la onda folicular y la síntesis de estradiol por parte de estos folículos (Kaneko *et al.* 1995). Algunas inhibinas

participan en la disminución de las concentraciones séricas de FSH, luego de la atresia folicular experimental de folículos se ha generado un incremento de los niveles de inhibina y luego de un tratamiento con sustancias proteicas, pertenecientes al líquido folicular ha inducido un efecto contrario (Ginther, 2000).

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1 UBICACIÓN**

Los ensayos se realizaron en el Establo de la Compañía Aura Germania, en el cantón Paján, provincia de Manabí, república de Ecuador, que tiene una extensión de 1.088,23 km<sup>2</sup>, y se localiza 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 (INEC 2017).

El clima que presenta, es muy marcado, una época seca con un clima tropical y fresco, y la época lluviosa húmeda y calurosa, su temperatura media anual es de 24 °C promedio, con precipitaciones anuales que varían desde 1000 a 2000 mm<sup>3</sup>/año, con una humedad relativa anual 87 % (INEC 2017).

La ganadería cuenta con una población total de alrededor de 1500 bovinos de diversas edades y estados fisiológicos. Los animales se mantuvieron en potreros y con suplementación concentrada cubriendo sus requerimientos de acuerdo a edad, peso, producción y estado fisiológico. Cuenta con instalaciones para manejo animal, bretes de inseminación y transferencia embrionaria. Los animales experimentales fueron seleccionados de la población de ganado disponible y de acuerdo a cada uno de los diseños de cada ensayo. Todos los animales fueron de la raza Brahmán que es la raza más difundida en la producción de ganado de carne a pastoreo a nivel nacional.

#### **3.2 ENSAYO 1: RELACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA (AMH) SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR DE HEMBRAS BOVINAS *BOS INDICUS*.**

El trabajo se realizó con una población de 60 hembras de la raza Brahman. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con arreglo factorial de los tratamientos. El factor A correspondió a la categoría del animal (vacas y vaquillas) vaquillas entre 24 y 30 meses (n=30), y vacas con más de 3 años de edad (n=30) y el factor B correspondió a los niveles de la hormona antimülleriana (100-200; 200-300 µg/ml y >300 µg/ml) establecidos de acuerdo al muestreo de sangre.

### **3.2.1 ANIMALES Y MANEJO.**

Se seleccionaron al azar 60 hembras bovinas, divididas en dos categorías, vaquillas entre 24 y 30 meses (n=30), y vacas con más de 3 años de edad (n=30), condición corporal (CC) de 2,75 a 3 (escala del 1 al 5), de una población de animales de alto valor genético de la raza Brahmán. Las que fueron sometidas a una revisión ginecológica con ultrasonografía con ecógrafo (Mindray DP 50 VET®, Shenzhen, China) y transductor lineal de 7,5 MHz en modo B donde se verificó que no existan patologías como endometritis, piometra o algún tipo de inflamación, que los animales no sean pre púberes, que se encuentren ciclando o que no presenten quistes ováricos.

Se estableció un protocolo de sincronización de la ovulación, obteniendo el reinicio de una nueva onda folicular en todos los animales. Para ello se insertó un dispositivo con progesterona en el Día 0 (DIB 0,5 Zoetis) y una dosis de 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol; 1mg/mL; benzoato de Zoetis), el Día 8 se retiró el dispositivo, se inyectó 0,15mg de prostaglandina (Ciclase, Zoetis), el Día 9 se inyectó 1 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol, Zoetis). Después 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 4, 6, 8, 9, 10, y 13 posteriores a la inserción del dispositivo de P4. Todas las determinaciones sanguíneas fueron tomadas en el día que inició el protocolo de sincronización, antes de la aplicación hormonal.

### **3.2.2 VARIABLES ESTUDIADAS**

- Número de folículos ováricos pequeños 2 a 4mm (ud.)
- Número de folículos ováricos grandes >4mm (ud.)
- Total de Número de folículos ováricos (ud.)
- Tamaño de folículos (mm)
- Tamaño de cuerpos lúteos (mm)
- Tamaño de ovario (cm)
- Nivel de concentración de AMH en suero sanguíneo (pg/ml)

### **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, desde el inicio de la onda folicular los días 4, 6, y 8.

### **Tamaño de cuerpo lúteo.**

Los cuerpos lúteos fueron determinados de la misma forma que los folículos, con la diferencia que su evaluación se efectuó 72 horas posteriores a los signos de celo (día 13 de iniciado el protocolo).

### **Tamaño de ovario.**

El tamaño ovárico de los animales también fue medido por ecografía transrectal con el mismo equipo y de la misma manera que los folículos, se efectuó el día 4.

### **Nivel de concentración de AMH en suero sanguíneo.**

Las colecciones de sangre (4 ml) para los análisis de la AMH en todos los animales bajo estudio, fueron tomadas por punción de la vena yugular con agujas calibre 16 x 1 ½, para ello se utilizaron 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 UNIMEVET, ubicado en el catón Guayaquil, Ecuador, 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, se realizó utilizando *kits* MOFA®, de la empresa MINITUBE, específico para especie bovina (AMH ELISA simple test Kit Bovine Serum, 40 samples Max/Kit 21700/100) y un lector Infinite 200 PRO Multimode Multiplate Reader, de acuerdo a los métodos descritos por Monniaux *et al.* (2008), Rico *et al.* (2009) y Rico *et al.* (2012). 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 agitaron en vortex y luego se llevaron a centrifugación, 3.200 rpm por 10 minutos a 4°C. Las muestras se conservaron a 4°C en expuestas a un primer

anticuerpo, durante 12 horas, luego por 1,5 horas a temperatura ambiente expuestas del segundo anticuerpo para luego hacer las lecturas.

### 3.2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para las variables, número de folículos pequeños (2-4mm), grandes (>4mm) y número total de folículos, tamaño de cuerpo lúteo, tamaño de ovario, se realizó una descripción estadística de las variables, a través de medidas de tendencia central (medias) y dispersión (desviación estándar y error estándar de la media).

Previo al análisis de varianza (ANOVA), los valores de las variables cuantificadas fueron examinados por la prueba de normalidad de los errores de Shapiro-Wilk (1965) modificado por Rahman & Govindarajulu (1997) y la de homogeneidad de varianza de Bartlett. Los análisis de varianza se realizaron de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Y = Variable de respuesta estudiada (folículos pequeños, grandes, total de folículos, tamaño de cuerpo lúteo, tamaño de ovario)

$\mu$  = Media de la característica

$\alpha_i$  = Efecto del *i* – ésimo factor A (categoría animal)

$\beta_j$  = Efecto del *j* – ésimo factor B (rango AMH)

$\alpha\beta_{ij}$  = Efecto de la interacción entre el factor A y B

$\epsilon_{ijk}$  = Error residual

Luego se procedió a las comparaciones múltiples de medias por medio del método de la diferencia significativa honesta de Tukey a un nivel de significancia del 5%

También se realizaron ecuaciones de predicción para las variables: número de folículos ováricos, tamaño de los folículos, tamaño de los cuerpos lúteos, tamaño de los ovarios. Se ejecutó regresiones lineales entre las variables AMH y número de folículos pequeños, folículos grandes y folículos totales; AMH y edad; edad y número de folículos pequeños,

folículos grandes y folículos totales; tamaños de ovario y número de folículos pequeños, folículos grandes y folículos totales; de acuerdo al modelo siguiente:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \epsilon_i$$

Donde

$Y_i$  = Variable de respuesta estudiada (estructuras ováricas, número de folículos, cuerpos lúteos)

$\beta_0$  = Intercepto

$\beta_1$  = Constante del valor estimado (pendiente).

$X_1$  = Valores de la variable independiente (concentración de hormona).

Además regresiones no lineales (cuadráticas) ajustadas a modelos de acuerdo a las observaciones entre las variables AMH y número de folículos pequeños, folículos grandes y folículos totales, siendo el modelo a seguir el siguiente:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 X^2$$

Donde

$Y_i$  = Variable de respuesta estudiada (número de folículos ováricos)

$\beta_0$  = Intercepto

$\beta_1$  y  $\beta_2$  = Constante del valor estimado.

$X_1$  = Valores de la variable independiente (concentración de hormona).

### **3.3 ENSAYO 2: RELACIÓN ENTRE NIVELES CIRCULANTES DE AMH Y LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA EN HEMBRAS BRAHMAN.**

El ensayo estuvo conformado por un total de 21 animales. Se utilizó el diseño experimental completamente aleatorizado con arreglo factorial de los tratamientos. El factor A correspondió a la categoría del animal (vacas y vaquillas) y el factor B correspondió a los niveles de la hormona antimülleriana (100-200; 200-300  $\mu\text{g/ml}$  y 300-450  $\mu\text{g/ml}$ ) establecidos de acuerdo al muestreo de sangre derivado del primer ensayo. Cada animal

representó una unidad experimental y se tomaron al menos tres repeticiones por cada combinación de tratamientos.

### **3.3.1 ANIMALES Y MANEJO.**

Se eligieron 21 hembras Brahman como donadoras de alto valor genético y una condición corporal (CC) de 2,5 a 3 (escala del 1 al 5), evaluado por un solo operador.

Continuadamente se realizó el protocolo de superovulación Anexo 6- 7, para esto se utilizaron. Dispositivos de silicona inerte impregnado con 0,5gr y 1gr de Progesterona natural de liberación controlada de un solo uso (DIB® 0.5) Zoetis, análogo sintético del 17 $\beta$  estradiol Benzoato de Estradiol 1 mg/1 ml (Gonadiol) Zoetis, análogo de prostaglandina Cloprostenol base 250 ug/ml (Ciclase DI) Zoetis, progesterona 25 mg/ml (Gestavec® 25) Vecol, GnRH Gonadorelina 0,005 g, Ceva Sante Animale France, y gonadotrofinas hipofisarias de cerdo; cada frasco de 20 ml de Folltropin-V (Bioniche) que contiene FSH equivalente a 400 mg de NIH-FSH-P1, diluido en un vial de 20 ml de inyección de cloruro de sodio bacteriostático USP.

A las 48 horas después de la primera aplicación de PGF2a, se realizó primera inseminación artificial (IA) a todas las donadoras, también se inyectó una dosis (100 $\mu$ g que equivalió a 2mL) de GnRH y la segunda IA se la realizó 24 horas pos primera inseminación.

La colecta de embriones se realizó el día 15, (7 días después de la primera I.A), para esto se llevó a las vacas donantes a la manga, se lavó la base de la cola y vulva, también se inyectó 2 ml de lidocaína al 2% vía epidural, para causar inmovilización de la cola del animal y disminuir movimientos peristálticos.

Luego se realizaron las ecografías con un equipo (Mindray DP50VET®, Shenzhen, China) con un transductor lineal con 7,5 MHz y en modo B para evaluar la respuesta superovulatoria mediante el conteo de los cuerpos lúteos y de los folículos anovulatorios antes de iniciar la colecta de los embriones.

A la postre se procedió a realizar el lavado en ambos cuernos uterinos y la colecta de embriones utilizando la técnica de circuito abierto con flujo discontinuo, con una mano cubierta con un guante, se introdujo por el recto, donde manipularon, cérvix y uterinos, con la otra mano, por vía vaginal, se introdujo el mandril cubierto con una sonda de dos vías (Bioniche Animal Health Inc., Pullman, WA, USA), utilizando dos tipos de calibres (16 y

20), para las vaquillas y vacas respectivamente, previamente esterilizado con alcohol y luego pasado por solución buffer de fosfato (PBS) solución que contiene 0.1% de alcohol polivinílico como surfactante, kanamicina y gentamicina.

Una vez introducida la sonda llevando en su interior el mandril, se guio la sonda hasta uno de los cuernos, una vez ubicado se inyectó con aire por la vía que se dirige hacia el balón del catéter con 8 a 15 ml aproximadamente, hasta quedar fijada la sonda al cuerno, se extrajo el mandril y se procedió con las inyecciones cargadas de medio que contenía PBS. Con volúmenes entre 20 ml a 50 ml por cada inyección (10 a 12 inyecciones) se utilizaron aproximadamente 500 ml por cada cuerno.

Al mismo tiempo que se introdujeron los volúmenes de PBS, con la mano que se encontraba dentro del recto se vigilaba el llenado del cuerno, para luego masajear la porción del cuerno llenada, y en seguida extraer el volumen inyectado; el volumen extraído se depositó en los filtros para embriones (Filtro Em-Con <sup>TM</sup>; INCOLAmerica, Colombia) este procedimiento fue repetido de forma similar en el otro cuerno uterino, finalmente después de que se lavaron ambos cuernos, se inyectaron dosis de prostaglandina (PGF<sub>2a</sub>, 2 ml de Ciclase, Zoetis) a todas las donantes de embriones.

Luego de realizado la colecta de los embriones, se separaron del medio en el que fueron recolectados, utilizando filtración y drenaje, seguidamente se evaluaron por morfología y determinaron su utilización en un microscopio de contraste de fase de 20 a 40x. Se utilizaron medios holdings (Vigro Holding Plus, Bioniche Animal Health, Inc., Pullman, WA, USA).

Las estructuras embrionarias se clasificaron usando la referencia de la IETS (Stringfellow y Seidel; 2000). Anexo 7 y 8.

### **3.3.2 VARIABLES ESTUDIADAS**

Número de folículos anovulatorios (ud.)

Número de cuerpos lúteos (ud.)

Número de estructuras ováricas (ud.)

Número de estructuras embrionarias (ud.)

Número de embriones viables (ud.)

Número de embriones degenerados (ud.)

Número de ovocitos infertilizados (ud.)

Nivel de concentración de AMH en suero sanguíneo (pg/ml)

### **Número de folículos anovulatorios.**

El número de los folículos anovulatorios se determinó mediante el conteo, con ultrasonografía endorectal con ecógrafo (Mindray DP 50 VET®, Shenzhen, China) y transductor lineal de 7,5 MHz en modo B, el día de la colecta de embriones, previo a la cateterización de la donante.

### **Número de cuerpos lúteos.**

La respuesta superovulatoria de la misma forma se determinó por ultrasonografía mediante conteo del número de cuerpos lúteos, con ultrasonografía endorectal con ecógrafo (Mindray DP 50 VET®, Shenzhen, China) y transductor lineal de 7,5 MHz en modo B, el día de la colecta de embriones, previo a la cateterización de la donante.

### **Número de estructuras embrionarias, de embriones viables, degenerados y ovocitos infertilizados.**

Se determinaron a través de observación en el microscopio con aumento de 20 a 40x, luego la calificación de embriones viables se observaron características como: compactación de las células, tamaño de las células, color y textura de citoplasma, regularidad de la forma del embrión, presencia de vesículas, diámetro e integridad de la zona pelúcida.

Grado 1: Excelente o bueno (85% o más de regularidad morfológica)

Grado 2: Regular (50% o más de regularidad morfológica)

Grado 3: Pobre (25% o más de regularidad morfológica)

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

En este ensayo se consideraron como embriones viables para ser transferidos todos que se calificaron como grado 1 y 2.

### **Nivel de concentración de AMH en suero sanguíneo.**

Se utilizaron los resultados del análisis de AMH del primer ensayo, y los animales fueron seleccionados en base a los niveles plasmáticos de AMH en suero sanguíneo.

### **3.3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Para las variables, estructuras embrionarias, embriones viables, embriones degenerados, infertilizados, cuerpos lúteos, folículos anovulatorios y estructuras ováricas, se realizó una descripción estadística de las variables, a través de medidas de tendencia central (medias) y dispersión (desviación estándar y error estándar de la media).

Previo al análisis de varianza, los valores de las variables cuantificadas fueron examinados por la prueba de normalidad de los errores de Shapiro-Wilk (1965) modificado por Rahman & Govindarajulu (1997) y la de homogeneidad de varianza de Bartlett. En aquellos casos donde no se cumplieron los supuestos del ANAVA, se procedió a la transformación de los datos para lograr su verificación. Todos los análisis anteriormente mencionados fueron realizados con el software InfoStat® (Di Rienzo et al. 2017). Los análisis se realizaron de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Y = Variable de respuesta estudiada (estructuras embrionarias, embriones viables, embriones degenerados, infertilizados, cuerpos lúteos, folículos anovulatorios y estructuras ováricas)

$\mu$  = Media de la característica

$\alpha_i$  = Efecto del  $i$  – ésimo factor A (categoría animal)

$\beta_j$  = Efecto del  $j$  – ésimo factor B (rango AMH)

$\alpha\beta_{ij}$  = Efecto de la interacción entre el factor A y B

$\epsilon_{ijk}$  = Error residual

Luego se procedió a las comparaciones múltiples de medias por medio del método de la diferencia significativa honesta de Tukey a un nivel de significancia del 5%;

También se realizaron ecuaciones de predicción para las variables: estructuras embrionarias, embriones viables, y estructuras ováricas. Se ejecutaron regresiones lineales entre las variables nivel de AMH y número de estructuras ováricas; nivel de AMH y número embriones viables; de acuerdo al modelo siguiente:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \epsilon_i$$

Donde

$Y_i$  = Variable de respuesta estudiada (estructuras ováricas, embriones viables)

$\beta_0$  = Intercepto

$\beta_1$  = Constante del valor estimado (pendiente).

$X_1$  = Valores de la variable independiente (concentración de hormona).

Para conocer el grado de asociación entre las variables cuantitativas estudiadas se realizó un análisis de correlación estadístico a través del método de Pearson, para las variables: estructuras embrionarias, embriones viables, embriones degenerados, embriones infertilizados, cuerpos lúteos, folículos anovulatorios, estructuras ováricas recuperación de embriones.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 RELACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE AMH Y EL DESARROLLO FOLICULAR**

El análisis descriptivo de las variables evaluadas se muestra en el Anexo 1, donde se destaca que los niveles de AMH presentaron una media de 297,25  $\mu\text{g/ml}$ , evidenciando que el valor promedio se aproxima más al tercer cuartil (310,4  $\mu\text{g/ml}$ ), lo cual refleja una distribución sesgada hacia la izquierda, con pocos valores ubicados en los mayores niveles de AMH que tienen impacto sobre la media obtenida. Esta situación se evidencia en los elevados coeficientes de variación obtenidos para esta variable (62,46%). Además, la evaluación de la normalidad de los residuos, determinada a través de la prueba de Shapiro-Wilks (1965), modificado por Rahman & Govindarajulu (1997), ratificó que esta variable no tiene una distribución normal. Por su parte, la prueba de homocedasticidad de varianzas de Bartlett evidenció que esta variable no presenta varianzas homogéneas.

Para las variables número de folículos pequeños, folículos grandes y folículos totales, la media y la mediana mostraron valores similares, lo cual es indicativo de una distribución normal de los datos; los valores promedio fueron de 20,68; 14,22 y 34,88 con coeficientes de variación de 49,50; 36,29 y 39,83 para folículos pequeños, grandes y totales, respectivamente. Similarmente, el tamaño del cuerpo lúteo y el tamaño de los ovarios también mostraron valores similares de media y mediana, con coeficientes de variación relativamente bajos. La evaluación de los supuestos de normalidad de los errores y homogeneidad de las varianzas, indicó que todas estas variables siguieron una distribución normal y presentaron varianzas homocedásticas.

El análisis de varianza presentado en el Anexo 2 arrojó diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en el factor Rango de AMH, para las variables número de folículos pequeños, grandes y totales; mientras que para las variables tamaño del cuerpo lúteo y tamaño de ovarios no se detectaron efectos significativos. Para el factor categoría del animal (vacas y vaquillas) y para la interacción Categoría \* Rango AMH no se detectaron diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ) para ninguna de las variables.

De manera general, la tendencia de los valores promedios para los tres tipos de folículos cuantificados, es de aumentar a medida que se incrementan los niveles AMH (Tabla 1). En todos los casos, los valores más elevados del número de folículos pequeños, grandes y totales están vinculados al rango de > 300 pg/ml AMH, que resultaron estadísticamente superiores a los valores promedios observados en los otros dos niveles de la hormona (100-200 y 200-300 pg/ml), los cuales son similares entre sí.

Hernández (2012) comenta que en el ganado vacuno, las hembras nacen con alrededor de 200.000 folículos, de estos la mayoría en alguna parte de su desarrollo mueren por atresia folicular o apoptosis, muy pocos llegan a ser folículos ovulatorios. Al nacimiento los folículos están en la fase más elemental y se conocen como folículos primordiales. Posteriormente estos folículos se activan y se transforman en folículos primarios y secundarios, hasta este momento los folículos no tienen antro (etapa preantral) y su desarrollo es independiente de las gonadotropinas. Cuando los folículos forman el antro se conocen como folículos terciarios y su desarrollo es dependiente de las gonadotropinas (etapa antral).

**Tabla 1.** Comparación de los diferentes niveles de la hormona antimülleriana en relación al número de folículos, tamaño de cuerpo lúteo y tamaño de ovarios en Brahman.

Niveles AMH (pg/ml)	Número de folículos			Tamaño cuerpo lúteo (mm)	Tamaño ovarios (cm)	
	Pequeños	Grandes	Totales		Derecho	Izquierdo
<200	14,48b	12,58b	27,02b	13,93a	2,57a	2,65a
200-300	20,30b	13,24b	33,53b	14,27a	2,85a	2,82a
> 300	29,37a	17,17a	46,54a	15,28a	2,96a	2,91a

Letras diferentes indican diferencias significativas (P <0.05) entre las medias dentro de una columna

Ireland *et al.* (2008), afirman que las diferencias en el recuento folicular antral durante el ciclo estral, está muy relacionada con los niveles séricos de AMH. En tal sentido, Rojas *et al.* (2014) señalan que la AMH actúa inhibiendo el reclutamiento inicial de los folículos primordiales a primarios o disminuyendo el efecto de la hormona folículo estimulante sobre el crecimiento de folículos preantrales y antrales pequeños, con el fin de limitar el desarrollo

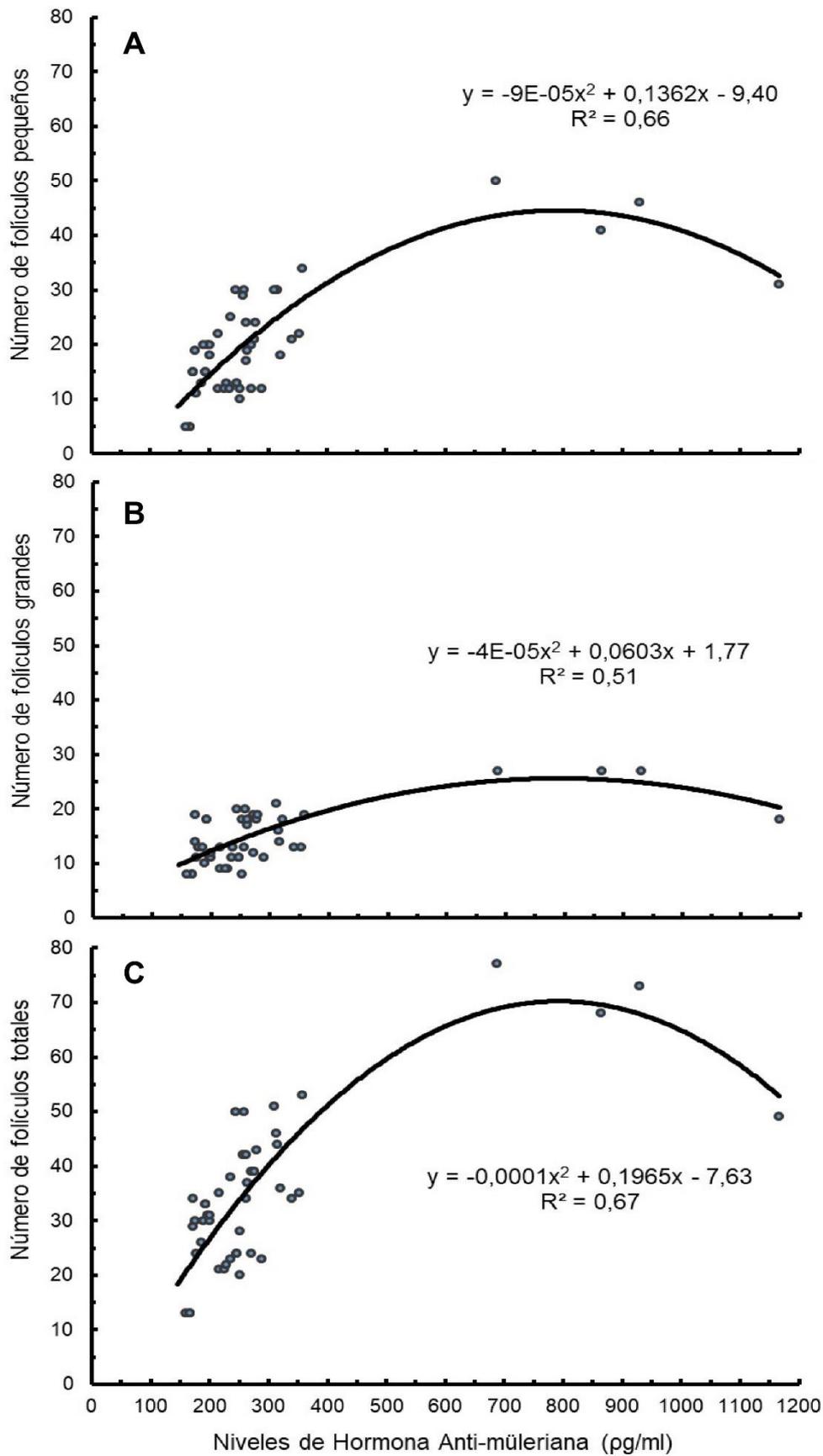
del número de folículos antrales, regulando el número de folículos preovulatorios o asegurando la maduración de un solo ovulo.

## **4.2 RELACIÓN ENTRE NIVELES DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA Y NÚMERO DE FOLÍCULOS**

La figura 1A muestra el comportamiento del número de folículos en función de los niveles de la hormona antimülleriana. De manera general, se obtuvo un ajuste de tipo cuadrático que resultó significativo ( $p \leq 0,05$ ); constándose una relación causa-efecto entre las variables estudiadas.

El análisis de regresión entre los niveles de la hormona antimülleriana y el número de folículos pequeños (Figura 1A) mostró diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), presentando un ajuste cuadrático explicado por la ecuación:  $\hat{y} = -0,00009X^2 + 0,1362X - 9,40$  con un  $R^2$  de 0,66. En el caso del número de folículos grandes (Figura 1B) se ajustó la ecuación:  $\hat{y} = -0,00004X^2 + 0,0603X - 1,77$  con un coeficiente de determinación de 0,51; mientras que para el número total de folículos (Figura 1C) presentó un ajuste cuadrático determinado por la ecuación:  $\hat{y} = -0,0001X^2 + 0,1965X - 7,63$  con  $R^2$  0,67.

La tendencia observada ratifica un mayor número de folículos pequeños con relación a los niveles de AMH hasta alcanzar un máximo, y luego varía ligeramente a medida que los folículos aumentan de tamaño, para los folículos pequeños el máximo se alcanzó con 757 (pg/ml), para los folículos grandes el máximo correspondió a 754 (pg/ml), mientras que para los folículos totales fue de 756 (pg/ml), y a partir de este punto ocurre un descenso en la población de folículos.



**Figura 1.** Relación entre niveles de la hormona antimülleriana en hembras Brahman (n = 60) y el número de folículos pequeños (A), grandes (B) y totales (C).

En consonancia con los resultados obtenidos, diversos estudios señalan que la población de folículos antrales se correlaciona positivamente con la hormona antimülleriana (Baldrighi *et al.* 2014; Guerreiro *et al.* 2014). La expresión de AMH se observa en células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales en crecimiento (Rico *et al.* 2012), y se describe como un modulador prematuro del crecimiento folicular al controlar el agotamiento prematuro de la reserva folicular en los ovarios (Monniaux *et al.* 2012 Durlinger *et al.* 2002). La expresión de AMH intrafolicular aumenta hasta que el tamaño del folículo es de 5 mm en las vacas (Rico *et al.* 2012) y luego comienza a disminuir en los folículos antrales más grandes (Monniaux *et al.* 2008).

Similarmente, García-Guerra *et al.* (2017) señalan que en el ganado vacuno, la síntesis de AMH ocurre en las células granulosas de los folículos preantrales grandes y folículos antrales pequeños. En el ganado bovino, la AMH circulante está altamente correlacionada con el conteo de folículos antrales y el número de ovocitos recuperados después de la captación del óvulo y la respuesta superestimuladora.

De igual manera en otro estudio realizado por Rico *et al.* (2009) demostraron que vacas con folículos antrales de 3-7 mm de diámetro tienen mayores concentraciones de AMH, en comparación con aquellas que tenían folículos mayores a 7 mm de diámetro, con lo que relacionan que los mayores niveles séricos de AMH están muy asociados con una mayor cantidad de los folículos antrales pequeños y medianos activos.

Gobikrushanth *et al.* (2017) encontraron que los niveles de la AMH obtuvieron mayor repetitividad que el número de folículos antrales, por lo cual sugieren que las concentraciones periféricas de AMH pueden ser un fenotipo más confiable que el conteo de folículos para evaluar la asociación con los resultados reproductivos, y establecieron correlaciones moderadas e independientes de las etapas foliculares.

Por su parte, Koizumi & Kadokawa (2017) no encontraron relación entre los niveles séricos de AMH y los folículos mayores de 5 mm, los folículos más grandes presentes en el ovario, el tamaño del cuerpo lúteo y la concentración sérica de progesterona, esto se debe a que la AMH plasmática se sintetiza a partir de células de la granulosa de los preantrales y folículos antrales pequeños (Bhide *et al.* 2016).

Varios estudios demuestran que los niveles plasmáticos de AMH son diferentes entre grupos genéticos y se correlacionan fuertemente con la cantidad de folículos antrales. Guerreiro *et*

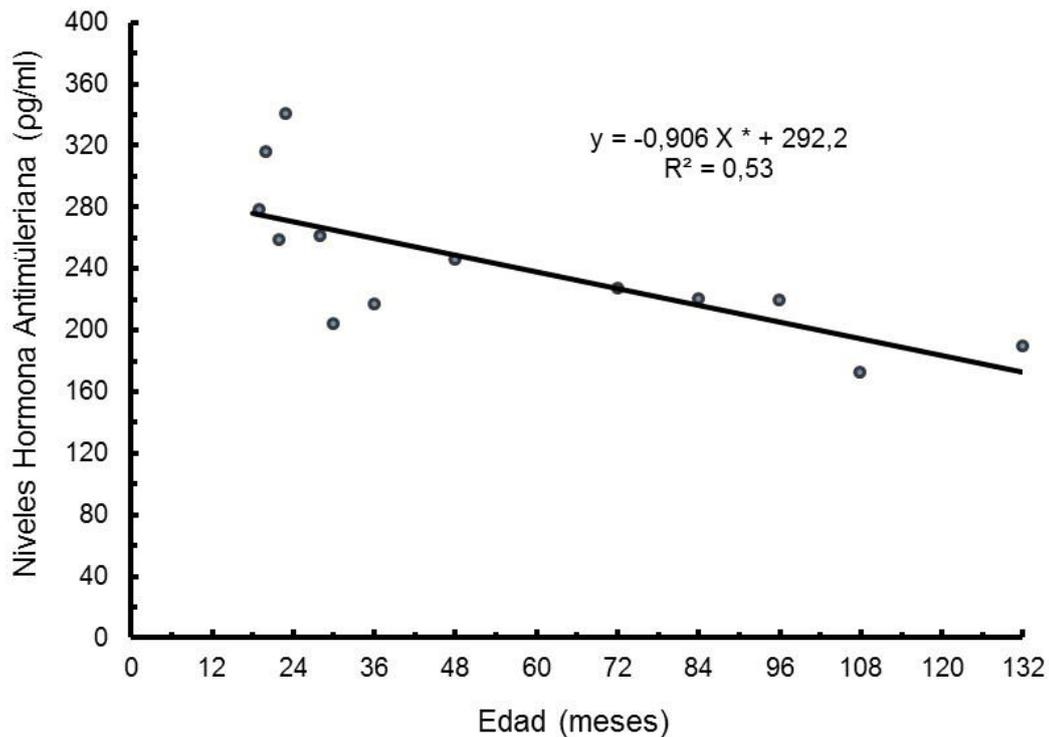
*al.* (2014) reportan que vaquillas Nelore de 24 a 26 meses de edad, los niveles séricos promedio de AMH fueron de 1400 pg/ml. Pfeiffer *et al.* (2014), constaron niveles séricos de AMH en vaquillas Angus y Charolais, de 42 y 54 pg/ml, respectivamente. En la raza Gir reportaron los niveles más altos de AMH 600 pg/ml, y del número promedio de folículos 60,0; muy diferente a lo encontrado en ganado Holstein 240 pg/ml de AMH y 35,9 folículos en promedio, en búfalos Murrah los niveles de AMH encontrados fue de 180 pg/ml y 25,6 folículos en promedio (Baldrighi *et al.* 2014).

En búfalos se ha demostrado que la concentración de AMH intrafolicular disminuye a medida que aumenta el tamaño folicular, y los folículos pequeños (3-5 mm) aportan la mayor parte de la AMH, de forma similar a otras especies, el contenido total de AMH disminuyó significativamente en los folículos medianos (5-8 mm) y se redujo aún más en los folículos grandes (> 8 mm) (Liang *et al.* 2016).

#### **4.3 RELACIÓN ENTRE EDAD DE LA HEMBRA Y LOS NIVELES CIRCULANTES DE AMH EN HEMBRAS BRAHMAN**

La relación entre la edad de los animales objeto de la investigación y los niveles de la AMH (Figura 2) demuestra una relación de causa-efecto del tipo inverso con ajuste lineal representado por la ecuación  $\hat{y} = - 0,906 X + 292,2$  y un coeficiente de determinación de 0,53; tal hallazgo ratifica que entre los 18 y 24 meses se constatan los mayores niveles plasmáticos de AMH. Estos resultados consolidan lo indicado en la Figura 3, en relación a la producción de folículos, que también mostraron tendencia a disminuir con la edad del animal.

En vacas Tabapuã, la reducción de la reserva folicular ocurrió en etapas más tardías, ya que el número de folículos antrales en vaquillas aumentó de forma constante hasta los 14 años de edad, momento a partir del cual ocurrió la disminución, lo cual explicaría por qué las vacas más viejas todavía son productivas en rebaños comerciales de Tabapuã en Brasil (Maculan *et al.* 2018). De manera similar, Martínez *et al.* (2016) observaron aumento del recuento de folículos antrales de hasta 10 años en las vacas Jersey y Holstein, momento a partir del cual ocurre la reducción del número de folículos.



**Figura 2.** Relación entre la edad de hembras Brahmán y los niveles plasmáticos de la hormona antimülleriana.

Contrariamente, Hirayama *et al.* (2017), no encontraron ningún efecto de la edad en las concentraciones de AMH o la población de folículos antrales; sin embargo, sus resultados indicaron que los niveles séricos de AMH fueron marcadores muy útiles en la predicción de respuestas superovulatoria en vacas de raza negra japonesa, pero las sesiones repetidas de superovulación reducen la precisión de la predicción, debido a la disminución de la respuesta ovárica y de los niveles de la AMH a través del tiempo.

Gobikrushanth *et al.* (2017) reportaron que el número de folículos ováricos antrales fue mayor en vacas que en novillas, pero no encontraron variaciones en la concentración plasmática de AMH entre las categorías; además, observaron alta correlación entre la concentración de la AMH y el recuento de folículos antrales en las novillas, que no fue significativa para las vacas.

Por su parte, Cardoso *et al.* (2018) encontraron que las vacas Girolando ( $\frac{3}{4}$  Holstein  $\times$   $\frac{1}{4}$  Gir) de 24 a 60 meses de edad tienen mayor cantidad de folículos que las novillas (12 a 14 meses de edad); pero, la concentración plasmática de AMH no difirió entre las categorías, obteniendo alta correlación entre el número de folículos y la concentración plasmática de

AMH, estos hallazgos sugieren su cuantificación como método de predicción de la población de folículos.

En el caso de ganado de la razas Bradford y Hereford, Santa Cruz *et al.* (2018), encontraron correlaciones entre las concentraciones de la AMH y el número de folículos antrales, siendo de mayor magnitud para las novillas Bradford de dos años de edad, estos resultados indican que las variables mencionadas no son útiles para seleccionar las novillas Hereford menos fértiles después del destete o el servicio previo, pero si son eficientes para seleccionar novillas Bradford cuando la evaluación se realiza en etapas posteriores al destete.

Batista *et al.* (2015) señalan que, independientemente del genotipo (*B. indicus* o *B. taurus*), las concentraciones plasmáticas de AMH fueron mayores en los terneros que en las novillas; sin embargo, el número de folículos visualizados en los ovarios fue mayor en las novillas *B. indicus* (Nelore) que en las terneras.

#### **4.4 RELACIÓN ENTRE EDAD DE LAS HEMBRAS BRAHMAN Y NÚMERO DE FOLÍCULOS ANTRALES.**

En lo referente a la relación entre las edades de los animales y el número de folículos, se obtuvo un ajuste lineal significativo e inverso ( $p \leq 0,05$ ) para las variables folículos pequeños y folículos totales, donde se evidencia que a medida que se incrementa la edad de las vacas disminuye la producción de folículos pequeños y totales (Figura 3). En el caso del número de folículos pequeños (Figura 3A) se ajustó la ecuación:  $\hat{y} = -0,12x + 27,3$  con un coeficiente de determinación de 0,55; mientras que el número total de folículos (Figura 3C) el ajuste correspondió a la ecuación:  $\hat{y} = -0,135x + 43,44$  con un coeficiente de determinación de 0,47. La ecuación de ajuste del número de folículos grandes (Figura 3B) no resultó significativa.

A pesar de que los coeficientes de resultaron significativos ( $p \leq 0,05$ ), el ajuste es relativamente bajo, lo cual implica la presencia de otras variables que condicionan la producción de folículos, probablemente asociada a una relación conjunto de la edad del animal y los niveles de la hormona antimulleriana, que explicaría de manera satisfactoria la respuesta biológica en relación al número de folículos.

Estos resultados difieren de los obtenidos por Gobikrushanth *et al.* (2018) quienes señalaron que las concentraciones circulantes de AMH aumentaron de manera directamente

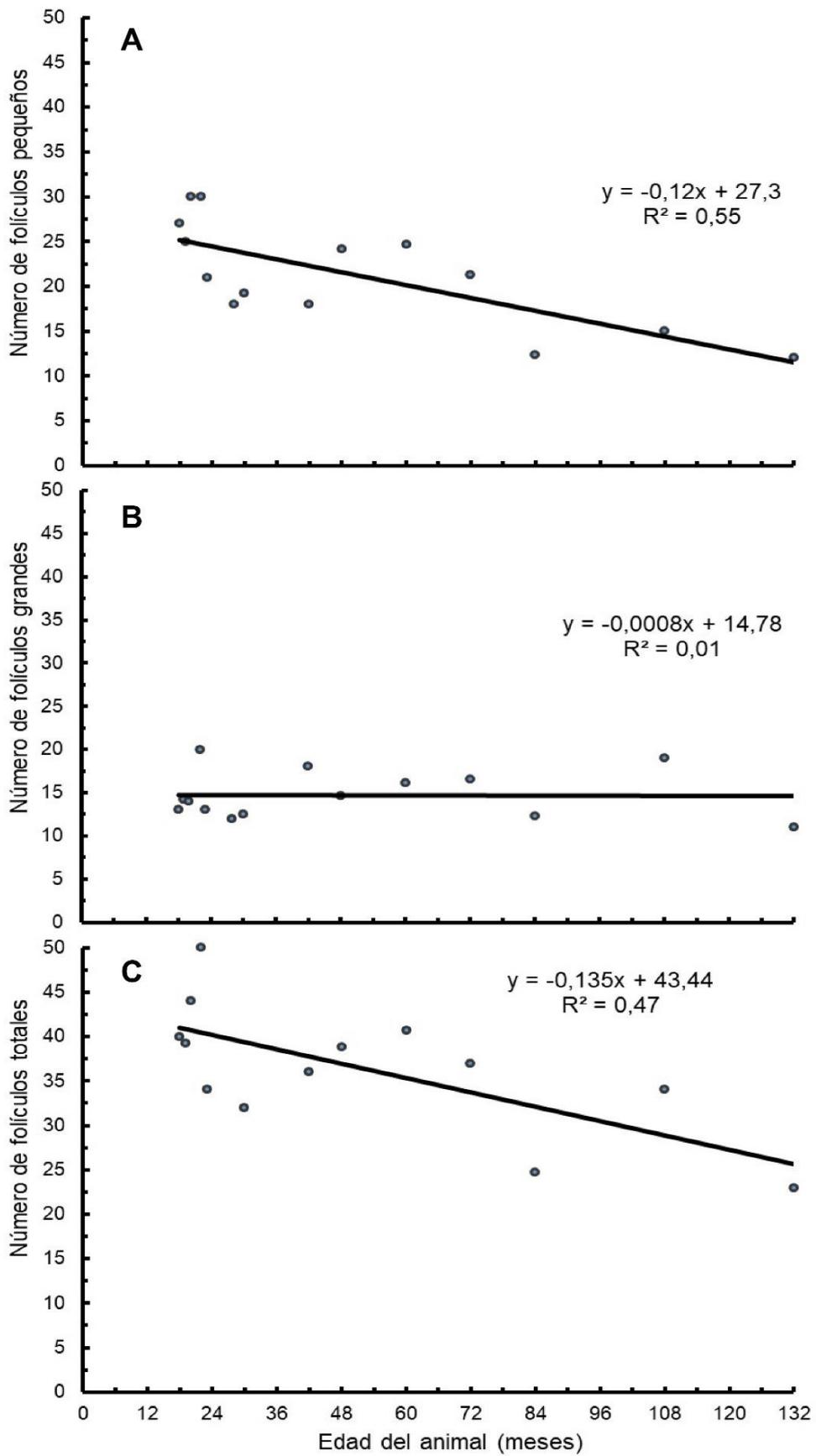
proporcional con el número de folículos hasta que las vacas alcanzaron los 5 años de edad y luego su población disminuyó, esto como resultado de un agotamiento en la reserva ovárica.

El desarrollo de ovarios y folículos primordiales ocurre durante el período fetal en varias especies de mamíferos, incluidos los rumiantes y los humanos, y a su vez, cada hembra individual nace con un número fijo de folículos primordiales, que se considera como la reserva ovárica (Yang & Fortune 2008; Ireland *et al.* 2011; Findlay *et al.* 2015). Dado que no hay desarrollo de folículos primordiales después del nacimiento, el tamaño de la reserva ovárica se agota a medida que los ciclos reproductivos continuos ocurren a medida que la hembra envejece hasta que queda un número limitado de folículos primordiales, momento en el cual la actividad ovárica se vuelve irregular y causa insuficiencia ovárica (Ireland *et al.* 2011; Richardson *et al.* 2014; Findlay *et al.* 2015).

Erickson (1976) reportó una gran variabilidad en cuanto a la cantidad de folículos ováricos de vaquillas, muestra que el número de folículos primordiales de vaquillas menores a 1 año fluctuó entre 60000 y 240000, mientras que en vacas fértiles comparadas con vacas infértiles de 5 años, existió una diferencia de 6 veces 119000 folículos versus 18000 folículos.

La disminución del número de folículos muestra el agotamiento de la reserva ovárica, debido a esto se puede inferir que los animales de mayor edad tengan menos folículos, con relación a los animales jóvenes. Esta relación fue observada también en vacas Holstein, por Burns *et al.* (2005), y en hembras mestizas por (Cushman *et al.* 2009)

Monniaux *et al.* (2014) afirman que las reservas de ovarios en el ganado bovino permanecen relativamente constantes hasta que alcanzan la edad de aproximadamente 4 a 6 años y descienden posteriormente. Por otra parte, Cushman *et al.* (2009) demostraron una disminución en AFC a partir de los 5 años en ganado de carne, mientras que Koyama *et al.* (2018) reportaron resultados similares para ganado lechero, señalando además la repetibilidad del número de folículos antrales del primer al tercer parto y una reducción a partir del cuarto parto.



**Figura 3.** Relación entre la edad de hembras Brahman (n = 60) y el número de folículos pequeños (A), grandes (B) y totales (C).

El *Bos indicus* muestra mayores niveles de AMH circulante en comparación con vaquillas *Bos taurus* 930 y 300  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente, Batista *et al.* (2014); mientras que, Ribeiro *et al.* (2014) reportan que vacas mestizas Jersey y Holstein  $\times$  Jersey tienen mayores niveles séricos de AMH que vacas Holstein.

Contrariamente, Hirayama *et al.* (2017) no encontraron ningún efecto de la edad en las concentraciones de AMH o la población de folículos antrales, sin embargo, sus resultados indicaron que los niveles séricos de AMH fueron marcadores muy útiles para la estimar las respuestas superovulatorias en vacas negras japonesas, pero las sesiones repetidas de superovulación reducen la precisión de la predicción, debido a la disminución de la respuesta ovárica y de los niveles de la AMH a través del tiempo.

Gobikrushanth *et al.* (2017) reportaron que el número de folículos ováricos antrales fue mayor en las vacas que en las novillas, pero no encontraron variaciones en la concentración plasmática de AMH entre las categorías, observando además una alta correlación entre la concentración de la AMH y el recuento de folículos antrales en las novillas, que no fue significativa para las vacas.

Por su parte, Cardoso *et al.* (2018) encontraron que las vacas Girolando ( $\frac{3}{4}$  Holstein  $\times$   $\frac{1}{4}$  Gir) de 24 a 60 meses de edad tienen mayor cantidad de folículos que las novillas (12 a 14 meses de edad); pero, la concentración plasmática de AMH no difirió entre las categorías, obteniendo una alta correlación entre el número de folículos y la concentración plasmática de AMH, con lo cual sugieren su cuantificación como método de predicción de la población de folículos.

En el caso de ganado de la razas Bradford y Hereford, Santa Cruz *et al.* (2018) encontraron correlaciones entre las concentraciones de la AMH y el número de folículos antrales, siendo de mayor magnitud para las novillas Bradford de dos años de edad, indicando que a partir de estos resultados muestran que las variables mencionadas no son útiles para seleccionar las novillas Hereford menos fértiles después del destete o el servicio previo, pero si son eficientes para seleccionar novillas Bradford cuando la evaluación se realiza en etapas posteriores al destete.

Batista *et al.* (2014) señalan que, independientemente del genotipo (*B. indicus* o *B. taurus*), las concentraciones plasmáticas de AMH fueron mayores en los terneros que en las novillas.

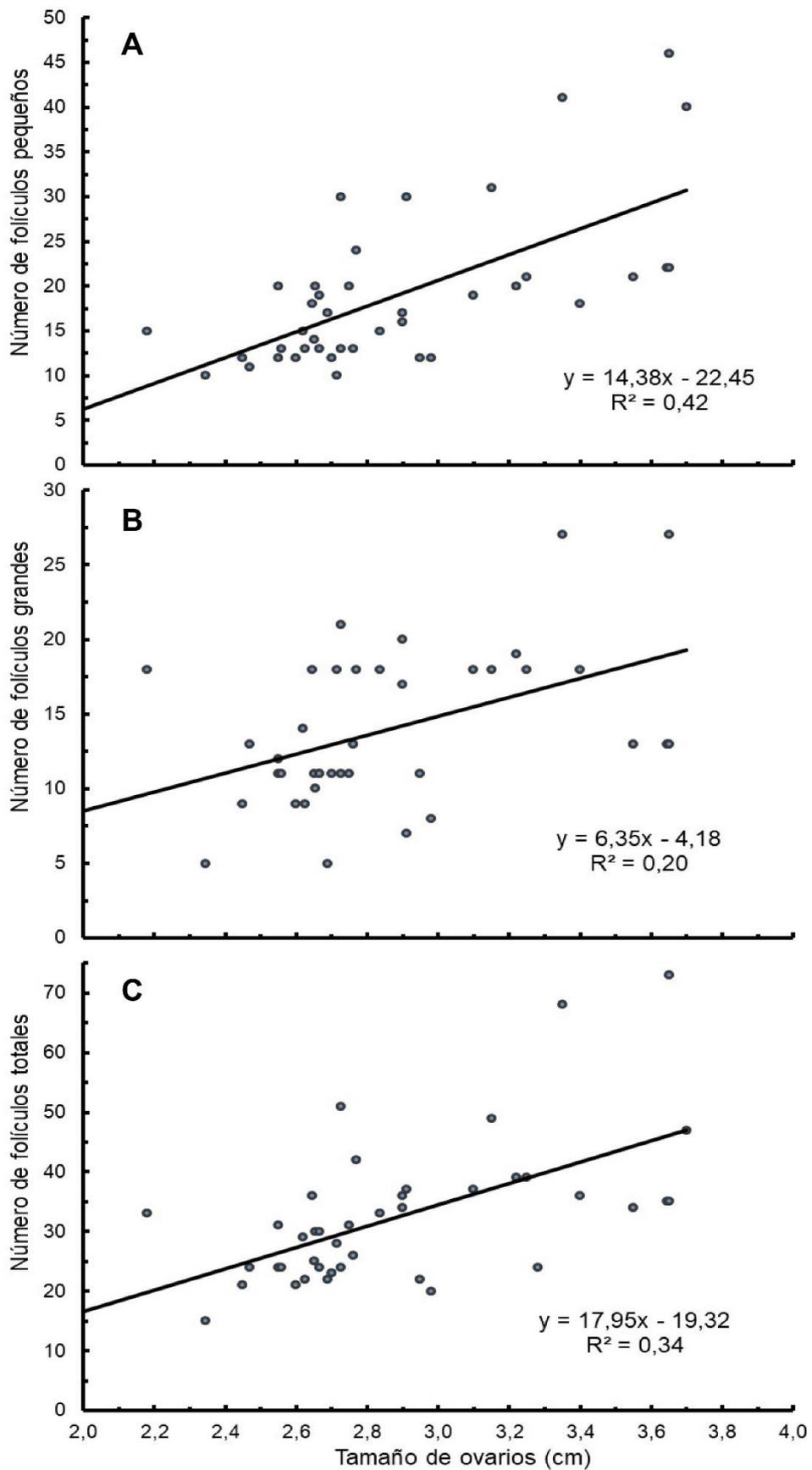
Sin embargo, el número de folículos visualizados en los ovarios fue mayor en las novillas *B. indicus* (Nelore) que en las terneras.

#### 4.5 TAMAÑO DE OVARIOS Y CUERPOS LÚTEOS

El análisis de varianza no mostró diferencias entre las categorías del animal ni los niveles de la AMH en relación al tamaño de los ovarios y el tamaño del cuerpo lúteo. Sin embargo, el análisis de correlación reportó una asociación directa y significativa entre el tamaño de los ovarios y el número de folículos, lo cual coincide con diversos trabajos en ganado bovina, donde se ha reportado que los ovarios grandes se relacionan con un mayor conteo de folículos antrales (Cushman *et al.* 2009; Ireland *et al.* 2011; Modina *et al.* 2014).

En el caso del número de folículos pequeños (Figura 4A) se ajustó la ecuación:  $\hat{y} = 14,38x - 22,45$  con un coeficiente de determinación de 0,42; para el número de folículos grandes (Figura 4B), la ecuación ajustada fue  $\hat{y} = 6,35x - 4,18$  con un coeficiente de determinación de 0,20; mientras que el número total de folículos (Figura 4C) el ajuste correspondió a la ecuación:  $\hat{y} = 17,95x - 19,32$  con un coeficiente de determinación de 0,34. Es de hacer notar que a pesar de que los coeficientes de resultaron significativos, el ajuste de las ecuaciones es relativamente bajo, y en general, explican un porcentaje muy bajo a través del tamaño de los ovarios, que se complementa a través de las relaciones descritas para los niveles séricos de la hormona antimülleriana y la edad del animal.

Ireland *et al.* (2008) señalan que el tamaño de las estructuras reproductivas está relacionado con el conteo de folículos en las vacas Holstein, donde los mayores volúmenes de ovarios se asociaron con mayores valores y sugieren que las variaciones en el número de folículos antrales durante las ondas foliculares está relacionado de forma directa con los niveles séricos AMH, el tamaño del ovario y la cantidad de ovocitos con integridad morfológica. Resultados similares fueron informados por Eborn *et al.* (2013) en novillas Angus. McNeel *et al.* (2017) informaron que en las novillas *Bos taurus* el útero era más grande en los animales con mayor cantidad de folículos antrales.



**Figura 4.** Relación entre tamaño de ovarios de hembras Brahman ( $n = 60$ ) y número de folículos pequeños (A), grandes (B) y totales (C).

Varios investigadores (Singh *et al.* 2004; Ireland *et al.* 2007; Ireland *et al.* 2008) han informado 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 y concentraciones más bajas de progesterona y un grosor endometrial reducido de 0 a 6 del ciclo estral (Jiménez -Krassel *et al.* 2009).

La población de folículos antrales se ha relacionado con parámetros de fertilidad como el tamaño del ovario, el diámetro del cuerpo lúteo, el número de ovocitos sanos, el grosor endometrial, la concentración de progesterona, la tasa de preñez y el intervalo de parto (Jimenez-Krassel *et al.* 2009; Martinez *et al.* 2016) Por lo tanto, considerando la relación entre el número de folículos antrales y varias características relacionadas con la fertilidad, la selección de donantes podría realizarse mediante un solo examen de ultrasonido al comienzo de la vida reproductiva (Silva-Santos *et al.* 2014; Jiménez-Krassel *et al.* 2015; Morotti *et al.* 2017).

#### **4.6 RELACIÓN ENTRE NIVELES CIRCULANTES DE AMH Y LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA EN HEMBRAS BRAHMAN.**

El Anexo 3, muestra el análisis descriptivo de las variables consideradas en la evaluación de la respuesta superovulatoria y la sobrevivencia embrionaria. Al igual que en el ensayo anterior, los niveles de AMH presentaron una tendencia de distribución sesgada hacia la izquierda, con media de 276,12  $\mu\text{g/ml}$ , y un coeficiente de variación de 43,43%, lo cual no comprometió la distribución normal de los datos según la prueba de Shapiro-Wilks. Similarmente, las variables embriones viables, embriones degenerados y embriones infertilizados también presentaron distribución normal de sus residuos.

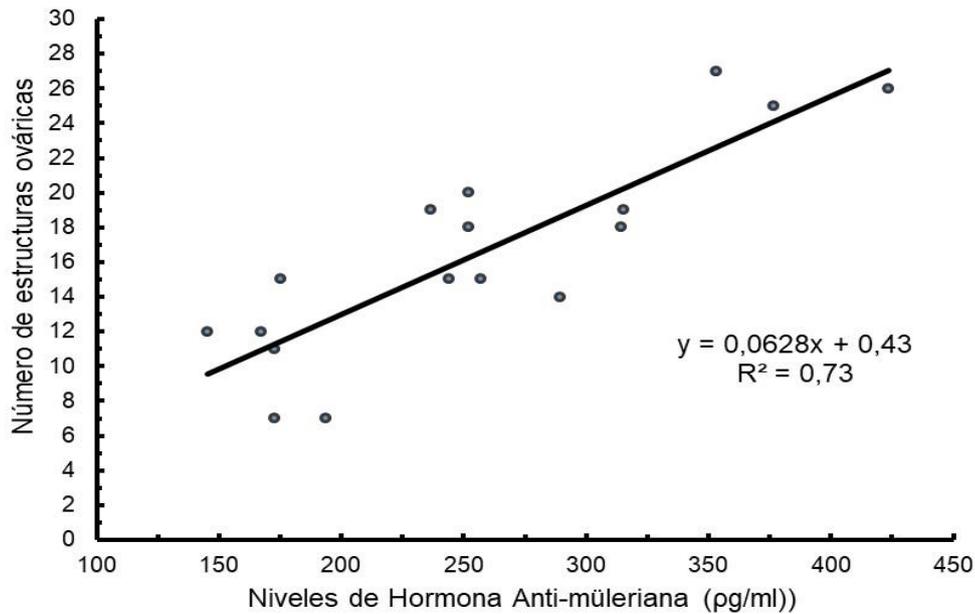
Por su parte, las variables cuerpos lúteos, folículos anovulatorios, estructuras ováricas y tasa de recuperación de embriones presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) cuando fueron sometidas al análisis de normalidad, indicando una distribución de los datos distinta a la normal. Adicionalmente, la prueba de homogeneidad de varianzas indicó que las variables cuerpos lúteos y folículos anovulatorios no presentan varianzas homocedásticas. Ante el incumplimiento de los supuestos del ANOVA en estas variables, se procedió a la transformación de los datos para cumplir dichos requerimientos.

El análisis de varianza para las variables cuerpos lúteos, folículos anavolutarios y estructuras ováricas están indicados en el Anexo 4. Se puede observar efectos significativos ( $p \leq 0,05$ ) para las variables cuerpos lúteos a nivel del factor categorías y para la variable estructuras ováricas dentro del factor rangos de AMH. No se distinguieron diferencias significativas para la interacción Categoría \* Rango AMH en ninguna de las variables mencionadas.

La comparación de los valores promedios por la prueba de Tukey entre las categorías de vacas y vaquillas ( $p \leq 0,05$ ), indican que los valores de los cuerpos lúteos en las vaquillas 13,7 presentan los mayores valores promedios, superiores a los observados para las vacas 8,81.

En relación a la variable estructuras ováricas, que resultó significativa ( $p \leq 0,01$ ), la comparación de los valores promedios de la variable estructuras ováricas por la prueba de Tukey indica que en los dos rangos superiores de la hormona (200-300 y >300  $\mu\text{g/ml}$ ) estudiados de la hormona antimulleriana ocurren los mayores valores promedios de estructuras ováricas 18,88 y 21,17 son similares entre si, a su vez resultaron estadísticamente superiores al menor rango de la hormona (<200  $\mu\text{g/ml}$ ) que presentó lo menores valores 10,67 de estructuras ováricas.

Para el caso de la variable número de estructuras ováricas (Figura 5), se observó tendencia de ajuste lineal, representada por la ecuación  $\hat{y} = 0,0628x+0,43$  con un coeficiente de determinación de 0,73. El número de estructuras ováricas aumenta a una tasa de 6,28% en la medida que ocurre el incremento de los niveles de la hormona antimulleriana.



**Figura 5.** Relación entre los niveles de la hormona antimülleriana y el número de estructuras ováricas en Brahman (n = 21).

Benyei *et al.* (2004) demostraron que el número de folículos antrales del ovario, y el número de ovocitos se encuentran muy correlacionados con los niveles séricos de AMH; mientras que Peña & Correa (2018) encontraron una relación significativa entre número de folículos, cuerpos lúteos y tasa ovulatoria con la concentración de AMH. Por su parte, Monniaux *et al.* (2010) reportaron que los niveles séricos de AMH en vacunos se constituyen en un excelente marcador endócrino de la reserva ovárica, ya que dicha predicción es uno de los objetivos más importantes cuando se realiza superovulación.

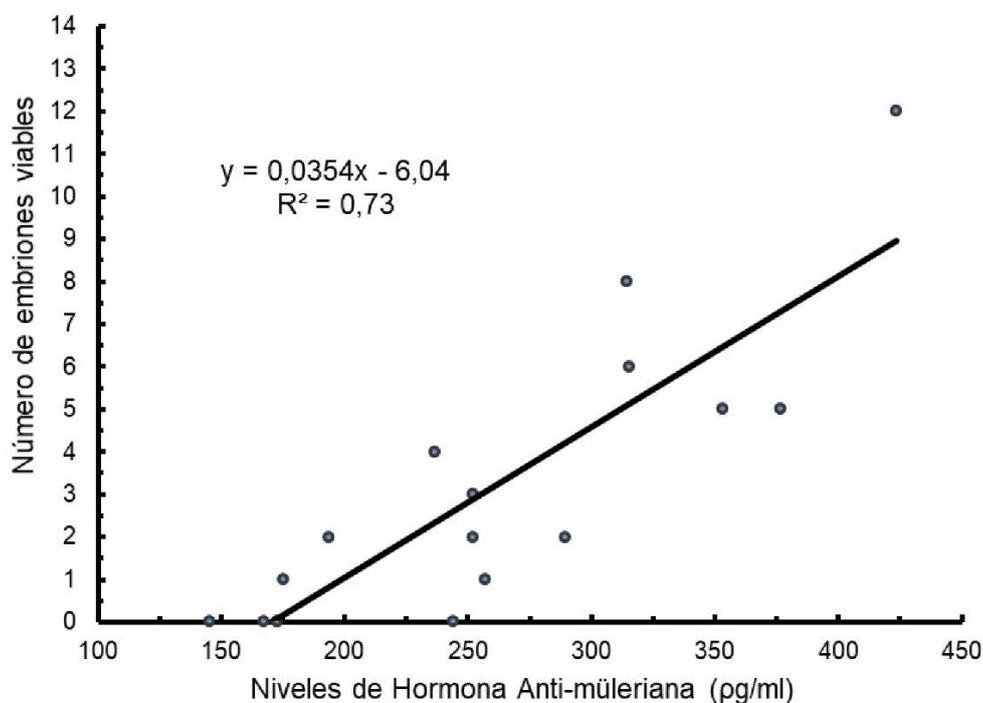
#### **4.7 RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES CIRCULANTES DE AMH Y LA CANTIDAD Y PROPORCIÓN DE EMBRIONES VIABLES.**

Del resumen del análisis de varianza que se muestra en el Anexo 5, para las variables, estructuras embrionarias, embriones viables, degenerados e infertilizados, y tasa de recuperación embriones; se constató efecto significativo ( $p \leq 0,01$ ), para la variable embriones viables para el factor principal rangos de la hormona antimülleriana. No se observaron efectos significativos para las otras variables tanto a nivel de los factores principales como en sus respectivas interacciones.

La comparación de los valores promedios de la variable embriones viables por la prueba de Tukey, mostró que en los valores más elevados de los rangos de la hormona antimülleriana

(>300  $\mu\text{g/ml}$ ) ocurrió la mayor cantidad 7,67 embriones viables promedio ( $p \leq 0,01$ ), valor estadísticamente superior al de los otros dos rangos (<200 y 200-300  $\mu\text{g/ml}$ ) 1,0 y 2,25 embriones viables respectivamente, los cuales fueron similares entre si.

Las relaciones cuantitativas de causa–efecto para las variables que resultaron significativas en el análisis de varianza del Anexo 5, particularmente a la variable número de embriones viables están representadas en el Figura 6. Se puede constatar que el ajuste de los valores resultó de naturaleza lineal positiva, representado por la ecuación  $\hat{y} = 0,0354x - 6,04$  con un coeficiente de determinación de 0,73. Se verifica que a medida que se incrementan los niveles de la hormona antimülleriana se acrecienta el número de embriones viables en la tasa de 3,54 %.



**Figura 6.** Relación entre los niveles de la hormona antimülleriana ( $n = 21$ ) y el número de embriones viables en Brahman.

El análisis de correlación entre las variables asociadas a la respuesta súper ovulatoria y la transferencia embrionaria en vaconas *Bos indicus* se muestra en el Tabla 5. El interés de su estudio radica en establecer relaciones funcionales entre las variables estudiadas a fin de poder estimar, a través de la evaluación de las variables de fácil medición, aquellas variables que pudieran resultar difíciles de evaluar y que serían de gran importancia en investigaciones posteriores.

La variable estructuras embrionarias mostró correlaciones significativas prácticamente con todas las variables evaluadas, a excepción de la variable folículos anovulatorios. En tal sentido, las relaciones más fuertes correspondieron a los cuerpos lúteos, estructuras ováricas y recuperación de embriones y en menor intensidad para los embriones degenerados, infertilizados y viables.

Por su parte, las estructuras ováricas mostraron correlaciones significativas con los folículos anovulatorios y con los cuerpos lúteos, y esta última variable, a su vez, mostró una correlación significativa con el número de embriones degenerados. Por otro lado, la recuperación de embriones, además de estar correlacionada con las estructuras embrionarias, mostró correlaciones significativas con las estructuras ováricas y con el número de embriones viables.

Estos resultados concuerdan con Center *et al.* (2018) reportaron que el número de folículos al inicio de la superovulación se correlacionaron positivamente el promedio de cuerpos lúteos y con el número de embriones, pero no obtuvieron correlaciones con el porcentaje de embriones viables o degenerados, o los ovocitos no fertilizados. Similarmente, encontraron correlaciones positivas entre el cuerpo lúteo y los embriones recuperados, y entre los embriones recolectados y los embriones degenerados. También reportaron que la AMH en circulación se correlacionó positivamente con folículos presentes al inicio de la superovulación y el número de cuerpos lúteos y embriones recuperados en la recolección; mientras que, Rico *et al.* (2009) encontraron correlaciones positivas entre niveles séricos de AMH y el número de folículos de 3 a 7 mm antes y después de la superovulación.

En un estudio posterior, Rico *et al.* (2012) y Souza *et al.* (2015) reportaron en vacas superovuladas, correlaciones positivas entre niveles séricos de AMH y el número de folículos pre ovulatorios durante el celo y número de cuerpos lúteos. De manera similar, Monniaux *et al.* (2010) igualmente reporta de manera concluyente que existe correlaciones positivas de entre niveles de AMH sérico y el número de embriones totales y transferibles. Por el contrario, Guerreiro *et al.* (2014) y Zacarias *et al.* (2018) no encontraron relaciones entre el nivel de esta hormona y las tasas de producción de embriones in vitro.

**Tabla 2.** Coeficientes de correlación de variables asociadas a la respuesta súper ovulatoria y la transferencia embrionaria en hembras Brahman.

<b>Variab</b> les	Estructuras embrionarias	Embriones viab	Embriones degenerados	Embriones infertilizados	Cuerpos lúteos	Folículos anovulatorios	Estructuras ováricas	Recuperación embriones
Estructuras embrionarias	1	0,036	0,008	0,028	0,001	0,333	0,001	0,001
Embriones viab	0,459*	1	0,438	0,267	0,087	0,911	0,128	0,034
Embriones degenerados	0,559**	0,179	1	0,252	0,021	0,761	0,060	0,211
Embriones infertilizados	0,478*	-0,254	-0,262	1	0,051	0,377	0,290	0,159
Cuerpos lúteos	0,882**	0,383	0,499*	0,431	1	0,091	0,002	0,088
Folículos anovulatorios	-0,222	-0,026	-0,071	-0,203	-0,378	1	0,031	0,621
Estructuras ováricas	0,656**	0,343	0,417	0,242	0,639**	0,471*	1	0,036
Recuperación embriones	0,693**	0,464*	0,285	0,319	0,381	0,115	0,459*	1

*Coefficiente de correlación por debajo de la diagonal principal. Probabilidad asociada a la prueba por encima de la diagonal principal.*

Zangirolamo *et al.* (2018) observaron una correlación positiva entre los parámetros cuantitativos como folículos aspirados totales, número de embriones recuperados, embriones cultivados y número de blastocistos producidos y las concentraciones de AMH en hembras de *B. indicus* (Nelore) y *B. taurus* (Holstein) donadoras. De esta manera, el recuento folicular antral ovárico y los niveles circulantes de AMH se recomiendan como herramientas para evaluar la reserva ovárica, ya que se ha correlacionado positivamente con parámetros como el número de ovocitos viables, blastocistos (Santos *et al.* 2016) y la tasa de concepción después de la IA (Mossa *et al.* 2012).

Investigaciones de Peña y Correa (2018) mostraron que el nivel de AMH sérico es un marcador útil para predecir el número de folículos, cuerpos lúteos y embriones colectados pos superovulación, estimando que por cada 1,000 pg de AMH en sangre incrementa el número de folículos, cuerpos lúteos y embriones recolectados en 5,08; 2,52 y 1,42, respectivamente. Esto concuerda con lo reportado por Ireland *et al.* (2007).

Lo anterior es un indicativo de que animales con niveles séricos de AMH elevados tienen mejor respuesta al tratamiento superovulatorio que los animales con niveles bajos. Un investigación realizada en vacunos por Ireland *et al.* (2007), muestra que los niveles séricos de AMH fueron alrededor de 6 a 2 veces mayores en los animales con un mayor recuento folicular en relación con que mostraron un menor número de folículos antrales, en comparación con los de baja concentración. En un estudio realizado en ganado Holstein y Nelore por Guerreiro *et al.* (2014), reportaron que las donantes de embriones con niveles séricos altos de AMH produjeron un cantidad significativamente mayor de embriones 3,0 y 7,0 respectivamente, comparado con las que mostraron niveles bajos de AMH 1,2 embriones en promedio para las Holstein y 2,2 para las Nelore.

Varios estudios han establecido una alta correlación entre el número de folículos antrales y la producción de embriones in vivo e in vitro, por lo cual sugieren que se puede utilizar como una herramienta auxiliar para seleccionar vacas donantes para embriones y ovocitos (Silva-Santos *et al.* 2014a; Baruselli *et al.* 2015; Ghanem *et al.* 2016).

Además, el tamaño de la reserva ovárica se asocia con la calidad del ovocito (Ireland *et al.* 2009), la competencia embrionaria (Tessaro *et al.* 2011) y la fertilidad (Mossa *et al.* 2012; Ribeiro *et al.* 2014; Jimenez-Krassel *et al.* 2015). Por lo tanto, no solo se espera que las vacas con reservas ováricas más pequeñas tengan una vida productiva más corta (Jiménez-Krassel

*et al.* 2015), sino que también tienen tasas de embarazo menores, más servicios por concepción e intervalos de concepción más largos (Mossa *et al.* 2012).

Cardoso *et al.* (2018) afirman que la AMH es un excelente marcador endocrino del número de folículos antrales pequeños, que es el objetivo directo de los tratamientos de estimulación ovárica. La concentración de AMH en plasma antes de la superovulación varía entre los animales y se correlaciona positivamente con el número de ovulaciones y embriones transferibles producidos (Monniaux *et al.* 2010; Rico *et al.* 2009).

Los animales con mayor número de folículos pequeños tienen una mayor probabilidad de producir un mayor número de embriones *in vitro*, lo que impulsa la aplicación de esta información como un rasgo de selección. Además, la alta variabilidad en población folicular antral entre individuos (Silva-Santos *et al.* 2014) y entre distintas razas bovinas ha sido bien documentada (Rodrigues *et al.* 2015; Oliveira Junior *et al.* 2015; Batista *et al.* 2014; Guerreiro *et al.* 2014; Rico *et al.* 2011), lo que indica que la población folicular antral es un rasgo importante para la selección de animales.

Nabenishi *et al.* (2017), trabajando con ganado negro japonés encontraron que en todas las etapas reproductivas, la concentración plasmática de AMH se correlacionó significativamente de manera positiva con el número de óvulos/embriones, embriones viables; sin embargo, esta correlación fue más débil durante el período de gestación que durante los períodos previos a la inseminación artificial y posparto.

Se ha encontrado correlación entre los niveles plasmáticos de AMH y una gran cantidad de folículos ováricos después de la superestimulación, número de cuerpos lúteos después de la superovulación (Rico *et al.* 2012, Rico *et al.* 2009, Souza *et al.* 2015) y número de embriones producidos en vacas primípara y multíparas (Souza *et al.* 2015). En tal sentido, Baruselli *et al.* (2015) verificaron que las concentraciones plasmáticas de AMH en vaquillonas *Bos indicus* y *Bos taurus* tiene una correlación positiva con el número de folículos totales aspirados, el total de complejos ovocito-cúmulo recuperados, número de complejos ovocito-cúmulo cultivados, y el número de embriones producidos por cada extracción de óvulos.

Ya se ha mencionado la relación directa y estrecha entre el recuento de folículos antrales y los niveles de la AMH. Monteiro *et al.* (2017) reportaron que para las subespecies *indicus* y *taurus* e *indicus* x *taurus*, se encontró una correlación positiva entre el número de folículos

antrales y la recuperación de ovocitos en las sesiones de extracción de óvulos y el número de embriones producidos in vitro, en consecuencia, las hembras con mayor número de folículos antrales presentaron una número mayor tasa de embriones in vitro en comparación con aquellas que tuvieron menor cantidad de folículos. Diversos reportes sugieren que el recuento de folículos antrales se asocia positivamente con el número de embriones producidos por el donante en diferentes razas (Ireland *et al.* 2008; Silva-Santos *et al.* 2015, Santos *et al.* 2016). Así mismo, estudios previos observaron una fuerte relación positiva entre los niveles circulantes de AMH y la producción de embriones in vivo después de la superovulación en ganado lechero (Monniaux *et al.* 2010, Rico *et al.* 2012, Souza *et al.* 2015).

Avilés *et al.* (2017) proporcionaron evidencia para considerar a la AMH como un marcador endocrino que puede predecir la fertilidad en vacas de raza Holstein, al encontrar que vacas con niveles  $> 300$   $\mu\text{g/ml}$  de AMH, tuvieron una mayor porcentaje de preñez, menor número de servicios por concepción, y además menos días abiertos en comparación con vacas con niveles ( $< 300$   $\mu\text{g/ml}$ ) unadas fueron sometidas a un protocolo de sincronización.

El recuento de folículos antrales es una característica determinante en la hembra bovina, y su influencia sobre la eficiencia de las biotecnologías reproductivas y el rendimiento reproductivo en el ganado bovino, y tiene una alta variación entre los animales y una alta repetibilidad dentro de los individuos. Bajo el enfoque relacionado con el impacto de la producción de embriones para la ganancia genética y el rendimiento reproductivo del ganado, refuerza el concepto de que el recuento de folículos antrales es una herramienta útil para la producción de embriones en ganado bovino (Morotti *et al.* 2017).

#### **4.8 NIVELES DE CONCENTRACIÓN CIRCULANTE DE AMH PARA LA SELECCIÓN DE HEMBRAS BRAHMAN DONANTES DE EMBRIONES.**

Ya se ha mencionado que hay diferencias en los niveles séricos de novillas de *Bos indicus* y *Bos taurus* (Batista *et al.* 2014) e incluso dentro de razas de la misma especie (Ribeiro *et al.* 2014). Sin embargo, Center *et al.* (2018) encontraron que se recuperaron más embriones de las vacas con el mayor recuento de folículos, y por lo tanto, mayores niveles de AMH, en comparación con las vacas que tienen un menor recuento de folículos.

Diversos estudios han demostrado la afectación del número de folículos antrales por las condiciones ambientales, por el estado sanitario y nutricional durante el embarazo (Ireland *et al.* 2011; Mossa *et al.*, 2012).

Por su parte, Morotti *et al.* (2017) afirman que la selección de hembras basada en el recuento de folículos antrales ha sido una práctica común antes de comenzar con algunas biotecnologías reproductivas, ya que los programas de producción de embriones han priorizado a los donantes con un alto recuento de folículos debido a los beneficios cuantitativos implícitos.

Bajo las condiciones de esta investigación, se obtuvo la tendencia a incrementar el número de folículos a medida que aumentaron los niveles de la hormona antimülleriana, pero se obtuvo una relación inversa con los incrementos en la edad de las hembras bovinas. Por su parte, la respuesta superovulatoria arrojó que los mejores resultados se obtuvieron en las hembras Brahman con niveles de AMH superiores a 300  $\mu\text{g/ml}$ , obteniéndose mayor formación de cuerpos lúteos, mayor cantidad de estructuras ováricas y mayor proporción de embriones viables. En virtud de estos hallazgos, es lógico pensar que lo ideal es seleccionar hembras bovinas de *Bos indicus* relativamente jóvenes con niveles de séricos de hormona antimülleriana superior a 300  $\mu\text{g/ml}$ , o en su defecto, ubicadas en el cuartil superior del rebaño evaluado.

## V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se desarrolló el estudio, se concluye:

1. El número promedio de folículos pequeños, grandes y totales, es mayor a medida que se detectan mayores niveles circulantes de AMH, hasta alcanzar un máximo alrededor de 756 pg/ml, y a partir de este punto ocurre un descenso en la población de folículos, como lo demuestran los resultados que se obtuvieron mediante un ajuste cuadrático.
2. La edad de las hembras Brahman tienen un ajuste lineal inverso con relación al nivel circulante de AMH, evidenciando que a medida que se incrementa la edad, disminuyen los niveles de AMH. Además la población folicular también tiene ajuste lineal inverso en relación a las edades de los animales, a medida que se incrementaron la edades de las hembras, disminuyó la población de folículos.
3. El número de estructuras ováricas y el número de embriones viables es mayor cuando las hembras se tienen mayores niveles circulantes de AMH, como mostraron los resultados, en ambos casos se obtuvo un ajuste lineal de pendiente positiva, que mostró que el número de estructuras ováricas y el número de embriones viables aumentaron con incrementos en los niveles de la hormona antimulleriana a tasas de 6,28% y 3,54%, respectivamente.
4. La variable estructuras embrionarias mostró correlaciones con los cuerpos lúteos, estructuras ováricas, recuperación de embriones, embriones degenerados, infertilizados y viables. Las estructuras ováricas mostraron correlaciones significativas con los folículos anovulatorios y con los cuerpos lúteos, mientras que la recuperación de embriones se correlacionó con las estructuras ováricas y con el número de embriones viables.

5. Los niveles circulantes mínimos de AMH, para hembras Brahman donadoras de embriones debe ser 300  $\mu\text{g/ml}$ , debido que los resultados revelaron, que esta correlacionado con el número de embriones que se obtienen

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Usar la medición sérica de AMH como herramienta previo a la selección de hembras donantes de embriones que serán sometidas a procesos de superovulación, de acuerdo a esta investigación la tendencia a incrementar los valores promedios de folículos pequeños, grandes y totales, a medida que aumentaron los niveles de la hormona antimülleriana.
2. Para la selección de hembras se deben preferir las que se encuentren entre el rango de  $> 300 \text{ } \mu\text{g/ml}$ , y  $756 \text{ } \mu\text{g/ml}$ , ya que a partir de este punto ocurre un descenso en la población de folículos, además se debe tener en cuenta la edad de los animales ya que a medida que avanza la edad su población folicular disminuye.
3. La selección de hembras bovinas de raza Brahman donadoras de embriones debe realizarse sobre animales relativamente jóvenes con niveles séricos de hormona antimülleriana superior a  $300 \text{ } \mu\text{g/ml}$ , debido que el número de estructuras ováricas y el número de embriones viables revelaron mayores valores en los niveles más altos de AMH

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aerts, J.; Bols, P. 2008. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Foliculogénesis and Pre-antral Follicle Development Reproduction in Domestic Animals, (45), 171-179. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2008.01302.x/abstract>.

Adams, G; Rajesh, J; Jaswant, S; Malhi, P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*. 69. 72-80. 10.1016/j.theriogenology.2007.09.026.

Avilés, AD; Villanueva, EN; Castro, MÁ; Algandar, RZ; Simental, JF; Guadalupe, M; Acosta S; Torres, A; Luna, P. 2017. La hormona anti-mulleriana como un marcador endócrino asociado a la fertilidad postparto en Vacas Holstein. *La Sociedad Académica*, núm. 49: 50-56.48.

Baldrighi, JM; Sá Filho, M.F; Batista, EO; Lopes, R.N; Visintin, JA; Baruselli, PS; Assunção, ME. 2014. Anti-Müllerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in murrrah heifers compared to holstein and gyr kept under the same management. *Reprod. Domest. Anim.* 49, 1015–1020.

Baruselli, PS; Batista, EO; Vieira, LM; Souza, H. 2015. Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. *Anim Reprod*, 12:487-497.

Batista, E; Macedo, G; Sala, R; Ortola, M; Sa Filo, M; Del Valle, T; Jesus, E; Lopez, R; Reno, F; Baruselli, PS. 2014. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in bos indicus (Nelore) and bos Taurus (Holstein) heifers. *Reproduction in domestic Animal*. 49, 1015-1020.

Batista, EB; Guerreiro, BG; Freitas, JC; Silva, LM; Vieira, RM; Ferreira, RG; Resende, AC; Basso, RN; Lopes, FP; Rennó, AH; Souza; Baruselli, PS. 2015. Plasma anti-Mullerian hormone as predictive endocrine marker for selection of Bos taurus (Holstein) and Bos indicus (Nelore) calves to in vitro embryo production. Submitted for publication.

- Benyei, B; Gaspardi, A; Komlosi, I; Pecs, A. 2004. Repeatability and heritability of ovulation number and embryos in dam-daughters pairs in superovulated Holstein-Friesian cows. *Reprod. Domest. Anim.* 39, 99-102.
- Bhide, P; Homburg, R. 2016. Anti-Müllerian hormone and polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*; S1521-6934: 30002-30005.
- Bó, GA; Mapletoft, RJ. 2003. Superovulación en Bovinos. En: Reproducción en los animales domésticos, Tomo II. R. Ungerfeld. Montevideo, Uruguay. pp. 515-538.
- Booth, NY; McDonald, L. 1988. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. 5a. ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Braw-Tal, R. 2002. The initiation of follicle growth: The oocyte or the somatic cells? *Molecular and Cellular Endocrinology*, (187), 11-18. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720701006992>
- Broekmans, FJ; Visser, JA; Laven, JS; Broer, SL; Themmen, AP; Fauser, BC. 2008. Anti-Müllerian hormone and ovarian dysfunction. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 19(9), 340-347.
- Burns, DS; Jimenez-Krassel, F; Ireland, JL; Knight, PG; Ireland, JJ; 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle evidence for high variation among animals very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.* 73, 54-62.
- Carvalho, JB; Carvalho, EL; Reis, M; Nichi, AH; Souza; Baruselli, PS. 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based times AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology* 69 (2): 167-175.
- Cardoso, CJ; De Oliveira Junior, JS; Kischel, H; Aparecido, W; Da Silva, L; Da Silva Arruda, E D; Souza-Cáceres, M; Mendes De Oliveira, F; Nogueira, E; De Paula Nogueira, G; Melo-Sterza, F. 2018. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictor of antral follicle population in heifers. *Anim. Reprod.* 15(1), 000-000.

Carlsson, IB; Scott, JE; Visser, JA; Ritvos, O; Themmen, AP; Hovatta, O. 2006. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Human reproduction*, 21(9), 2223-2227.

Center, K; Dixon, D; Looney, C; 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.

Cushman, R.A; Allan, MF; Kuehn, LA; Snelling, WM; Cupp, AS; Freetly, HC. 2009. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *J. Anim. Sci.* 87, 1971–1980.

De Vet, A; Laven, J; De Jhon, F; Themmen, A; Fauser, B. 2002. Antimullerian hormone serum level: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril.* 77, 357-362.

Durlinger, AL; Visser Jenny A; Themmen, AP. 2002. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction*, vol. 124, no 5, p. 601-609.

Eborn, DR; Cushman, RA; Echterkamp, SE; 2013. Effect of postweaning diet on ovarian development and fertility in replacement beef heifers. *J. Anim. Sci.* 91, 4168–4179.

Eppig, J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, (122), 829-838. Recuperado de <http://www.reproduction-online.org/content/122/6/829.short>

Erickson, BH; Reynolds, RA; Murphree, RL. 1976. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. *Biol. Reprod.* 15:555–560

Fanchin, R; Schonauer, L; Righini, C; Guibordenche, J; Frydman, R; Taieb, J. 2003. Serum anti-mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin  $\beta$ , estradiol, FSH and LH on day 3. *Human Reproduction.* 77, 323-327.

Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*, (78), 203-216. Recuperado de <http://mvz.unipaz.edu.co/textos/revistas/literatura-1/foliculos-competencia.pdf>.

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.

Findlay, JK; Hutt, KJ; Hickey, M; Anderson, RA; 2015. How is the number of primordial follicles in the ovarian reserve established? *Biol. Reprod.* 93, 111.

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.

Fortune, J. 2003. The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, (78), 135-163  
Recuperado de <http://mvz.unipaz.edu.co/textos/revistas/literatura-1/desarrollo-folicular.pdf>.

Fortune, JE. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of reproduction*, vol. 50, no 2, p. 225-232.

Fortune, J; Kito, S; Wandji, SA; Srsen, V. 1998. Activation of bovine and baboon primordial follicles in vitro. *Theriogenology*, (49), Suppl 2, 441-449.

García-Guerra, A; Motta, JC; Melo, LF; Kirkpatrick, BW; Wiltbank, MC. 2017. Ovulation rate, antral follicle count, and circulating anti-Müllerian hormone in Trio allele carriers, a novel high fecundity bovine genotype. *Theriogenology*, 101, 81-90.

Ghanem N, Jin Ji; Kim, SS; Choi, BH; Lee, KL; Ha, AN; Song; SH; Kong, IK. 2016. The Anti-Mullerian Hormone Profile is Linked with the In Vitro Embryo Production Capacity and Embryo Viability after Transfer but Cannot Predict Pregnancy Outcome. *Reprod Domest Anim*, 51:301-310.

Gigli, I; Russo, A; Agüero, A. 2006. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *Revista In Vet.* 8 (1). P 184.

Gilchrist, R; Ritter, L; Armstrong, D. 2004. Oocytesomatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science*. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432004001083>.

- Ginther, O; Kastelic, J; Knopf, L. 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular wave. *J. Reprod Fertil*, 87: 223-230.
- Ginther, O; Bergfelt, D; Beg, M; Kot, K. 2001. Follicle Selection in Cattle: Role of Luteinizing Hormone, *Biology of Reproduction* , Volume 64. [https://doi.org/ 10.1095 / biolreprod64.1.197](https://doi.org/10.1095/biolreprod64.1.197)
- Gobikrushanth, M., Dutra, PA; Bruinje, TC; Colazo, MG; Butler, ST; Ambrose, DJ. 2017. Repeatability of antral follicle counts and anti-Müllerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. *Theriogenology* 92:90–94.
- Gobikrushanth, M; Purfield, DC; Colazo, MG; Butler, ST; Wang, Z; Ambrose, DJ. 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.
- Guerreiro, BM; Batista, EO; Vieira, LM; Sá Filho, MF; Rodrigues, CA; Castro Netto, A; Silveira, CR; Bayeux, BM; Dias, EA; Monteiro, FM; Accorsi, M; Lopes, RN; Baruselli, PS. 2014. Plasma anti-müllerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domest. Anim. Endocrin.* 49:96–104.
- Hafez, EZ. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. Reproducción, hormonas y factores de crecimiento. Séptima edición. Mexico. McGrawHill. Pp 66-68.
- Henaó, G. 2010. Algunos factores relacionados con la dinámica folicular en *bos indicus*. *Revista. Fac. Nac. Agron. Medellín*, Volumen 63, Número 2, p. 5577-5586. ISSN electrónico 2248-7026. Medellín, CO.
- Hernández, CJ. 2012. Fisiología clínica de la reproducción de bovinos lecheros. Desarrollo folicular. Delegación Coyoacán México D.F. pp. 20-24.
- Hill, DJ. 1989. Growth factors and their cellular actions. *Journal of Reproduction & Fertility*, (85), 723-734. Doi: 10.1530/jrf.0.0850723.

Hirayama, H; Naito, A; Fukuda, S; Fujii, T; Asada, M; Inaba, Y; Takedomi, T; Kawamata, M; Moriyasu, S; Kageyama, S. 2017. Long-term changes in plasma anti-Müllerian hormone concentration and the relationship with superovulatory response in Japanese Black cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 63(1), 95-100.

INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, Ecuador). 2017 Recuperado de [http://app.sni.gob.ec/snmlink/sni/Portal%20SNI%202014/FICHAS%20F/1310\\_PAJAN\\_MANABI.pdf](http://app.sni.gob.ec/snmlink/sni/Portal%20SNI%202014/FICHAS%20F/1310_PAJAN_MANABI.pdf)

Ireland, J. (1987). Control of follicular growth and development. *Journal of reproduction and Fertility*. Supplement. 34. 39-54.

Ireland, JL; Scheetz, D; Jimenez-Krassel, F; Themmen, AP; Ward, F; Lonergan, P; Smith, GW; Perez, GI; Evans, AC; Ireland, JJ. 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, JJ; Smith, GW; Scheetz, D; Jimenez-Krassel, F; Folger, JK; Ireland, JL; Evans, AC. 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(1), 1-14.

Ireland, JJ; Ward, F; Jimenez-Krassel, F; Ireland, JL; Smith, GW; Lonergan, P; Evans, AC. 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.

Ireland, JJ; Zielak-Steciwko, AE; Jimenez-Krassel, F; Folger, J; Bettgowda, A; Scheetz, D. 2009. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biol. Reprod*. 80, 954–964.

Jimenez-Krassel, F; Folger, JK; Ireland, JL; Smith, GW; Hou, X; Davis, JS; Lonergan, P; Evans AC; Ireland, JJ. 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.

Jimenez-Krassel, F; Scheetz DM; Neuder, LM; Ireland, JL; Pursley, JR; Smith, GW; Tempelman, RJ; Ferris, T; Roudebush, WE; Mossa, F; Lonergan, P; Evans, JJ. 2015. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. *Journal of Dairy Science*. 98:3036-3045.

Kaneko, H; Kishi, H; Watanabe, G; Taya, K; Sasamoto, S; Hasegawa, Y. 1995. Changes in plasma concentrations of immunoreactive inhibin, estradiol and FSH associated with follicular waves during the estrous cycle of the cow. *J Reprod Dev*. 41: 311-320.

Knight, P; Glister, C. 2003. Local roles of TGF- $\beta$  superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal Reproduction Science*, (78), 165-183. Recuperado de <http://mvz.unipaz.edu.co/textos/revistas/literatura-1/ovarios-foliculos.pdf>.

Koizumi, M; 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.

Koyama, K; Koyama, T; Sugimoto, M. 2018. Repeatability of antral follicle count according parity in dairy cows. *Journal of Reproduction and Development*. (In press).

Liang, A; Salzano, A; D'esposito, M; Comin, A; Montillo, M; Yang, L; Campanile, G; Gasparrini, B. 2016. Anti-Mullerian hormone (AMH) concentration in follicular fluid and mRNA expression of AMH receptor type II and LH receptor in granulosa cells as predictive markers of good buffalo (*Bubalus bubalis*) donors. *Theriogenology*, 86(4), 963-970.

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.

Macmillan, K; 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 diestrus in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 6:245-254. 66 66.

Maculan, R; Pinto, TL; Moreira, GM; De Vasconcelos, GL; Sanches, JA; Rosa, RG; Bonfim, R; Gonçalves, T; De Souza, JC. 2018. Anti-Müllerian Hormone (AMH), antral follicle count (AFC), external morphometrics and fertility in Tabapuã cows. *Animal reproduction science*, 189, 84-92.

Martinez, MF; Sanderson, N; Quirke, LD; Lawrence, SB; Juengel, JL. 2016. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. *Theriogenology*, 85:466-475.

Mcneel, AK; Soares, EM; Patterson, AL; Vallet, JL; Wright, EC; Erin, LL; Amundson, OL; Miles, JR; Chase Jr, CC; Lents, CA; Wood, JR; Cupp, AS; Perry, GA; Cushman, RA. 2017. Beef heifers with diminished numbers of antral follicles have decreased uterine protein concentrations. *Anim. Reprod. Sci.* 179, 1–9.

Modina, S; Tessaro, I; Lodde, V; Franciosi, F; Corbani, D; Luciano, AM. 2014. Reductions in the number of mid-sized antral follicle are associated with markers of premature ovarian senescence in dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 26, 235–244.

Monniaux, D; Barbey, S; Rico, C; Fabre, S; Gallard, Y; Larroque, H. 2010. Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle?. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 1083-1091.

Monniaux, D; Di Clemente, N; Touzé JI; Belville, C; Rico, C; Bontoux, M; Picard, JY; Fabre, S. 2008. Intrafollicular steroids and anti - Müllerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol. Reprod.* 79, 387-396.

Monniaux, D. 2012. Superovulatory responses and embryo production in ruminants: Lessons from the ovaries. *Proceedings 28th Annual Meeting A.E.T.E.- Saint Malo, France, 7th – 8th September 2012.* P 7-27.

Monniaux, D; Clément, F; Dalbiès-Tran, R; Estienne, A; Fabre, S; Mansanet, C; Monget, P. 2014. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link?. *Biology of reproduction*, 90(4), 85-1.

Monniaux, D; Huet, C; Besnard, N; Clement, F; Bosc, M; Pisselet, C; Mariana, JC. 1997. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 51, 3-23.

Monteiro, FM; Batista, EO; Vieira, LM; Bayeux, BM; Accorsi, M; Campanholi, SP; Dias Ear; Souza, AH; Baruselli, PS. 2017. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. *Theriogenology*, 90:54-58.

- Moreira JH; De Moraes, F; Ferreira De Sa, EL; De Almeida, C. 2000. Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 35(12): 2501-2509
- Morotti, F; Santos, GM; Júnior, CK; Silva-Santos, KC; Roso, VM; Seneda, MM. 2017. Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in beef heifers. *Theriogenology*, 91, 21-26.
- Mossa, F; Walsh, SW; Butler, ST; Berry, DP; Carter, F; Lonergan, P; Smith, GW; Ireland, JJ; Evans, AC. 2012. Low numbers of ovarian follicles  $\geq 3$  mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J Dairy Sci*, 95:2355-2361.
- Mossa, F; Carter, F; Walsh, W; Kenny, D; Smith, G; Ireland, L; Hildebrandt, T; Lonergan, P; Ireland, J; Evans, A. 2013. Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. *Biol Reprod*. Vol. 88. p 92, 1-9.
- Motta, P; Ramos, N; Gonzales, C; Castro, E. 2011. Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *Revista Arq. Bras. Med. Vet. Zootec; vet.zootec*. 5(2): 88-99, 2011. Florencia, CO. p 91 - 95
- Nabenishi, H; Kitahara, G; Takagi, S; Yamazaki, A; Osawa, T. 2017. Relationship between plasma anti-Müllerian hormone concentrations during the rearing period and subsequent embryo productivity in Japanese black cattle. *Domestic animal endocrinology*, 60, 19-24.
- Nilsson, E; Parrott, J; Skinner, M. 2001. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, (175), 123-130. Recuperado de <http://skinner.wsu.edu/members/nilsson.html>.
- Oliveira Junior, JS; Cardoso, CJ; Silva, WA; Kischel, H; Souza, MB; Andrade, ER; Nogueira, E; Silva-Santos, KC; Seneda, MM; De Andrade; Melo-Sterza, F. 2015. Antral follicles population in heifers and cows of Nelore and Girolando breeds. *Semina: Ciênc Agrár*, 36:3741-3750.
- Peña, CM; Correa, CD. 2018. Respuesta superovulatoria asociada a los niveles de hormona antimulleriana en vacas donadoras. Trabajo de grado. Maestría en Ciencias en Sistemas de Producción Animal. Universidad Autónoma de Baja California. 65 p.

Peña, J; Góngora, M; Estrada, A; José, L. 2007. Factores de crecimiento en el desarrollo folicular, embrionario temprano e implantación. Implicaciones en la producción de embriones bovinos. Revista MVZ Córdoba [en línea], Fecha de consulta: 13 de septiembre de 2017. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69312110> ISSN 0122-0268

Pfeiffer, KE; Jurado, LJ; Larson, JE. 2014. Determination of anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. Domestic Animal Endocrinology. 46:58-64.

Perea, GF; González, F; Cruz, A; Soto, B; Rincón, U; González, S; Villamediana, MP. 1998. Evaluación ultrasonográfica de la dinámica folicular en vacas y novillas mestizas. Revista Científica FCV/LUZ 8(1): 14-24.

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.

Pierson, R ; Ginther, O. 1987. Ultrasonographic appearance of the bovine uterus during the estrous cycle. J. Vet. Med. Assoc., 190:995-1002, 1987.

Pursley, J; Mee, M; Wiltbank, M. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using pgf2 $\alpha$  and gnrh. Theriogenology 44:915-923

Rahman, M. M., Govindarajulu, Z. (1997). A modification of the test of Shapiro and Wilk for normality. *Journal of Applied Statistics*, 24(2), 219-236.

Ribeiro, E; Cerri, R; Bisinotto, R; Lima, F; Greco, L; Morrison, A; Kumar, A; Thatcher, W; 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

Richardson, MC; Guo, M; Fauser, BC; Macklon, NS. 2014. Environmental and developmental origins of ovarian reserve. Hum. Reprod. Update 20, 353–369.

Rico, C; Fabre, S; Médigue, C; Di Clemente, N; Clément, F; Bontoux, M; Touzé, JL; Dupont, M; Briant, E; Rémy, B; Beckers, JF; 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. *Biol. Reprod.* 80, 50-59.

Rico, C; Drouilhet, L; Salvetti, P; Dalbies-Tran, R; Jarrier, P; Touze, JL; Pillet, E., Ponsart, C., Fabre, S. And Monniaux, D. 2012. Determination of Anti-Mullerian Hormone Concentrations in Blood as a Tool to Select Holstein Donor Cows for Embryo Production: From the Laboratory to the Farm. *Reproduction, Fertility and Development*, 24, 932-944.

Rico, C; Medigue, C; Fabre, S; Jarrier, P; Bontoux, M; Clement, F; Monniaux, D. 2011. Regulation of anti-Mullerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. *Biol Reprod*, 84:560-571.

Rodrigues, AS, Oliveira, SN; Loiola, MV; Ferraz, PA; Chalhoub, M; Bittencourt, RF; Araujo EA; Bittencourt, TC; Ribeiro Filho, AL. 2015. Antral follicle count in Nelore females subjected to fixed-time artificial insemination. *Ciênc Rural*, 45:711-717.

Rojas, PP; Recabarren, MP; Palma, S; Maliqueo, M; Carrasco, A; Sir-Petermann, T; 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.

Santa Cruz, R; Cushman, RA; Viñoles, C. 2018. Antral follicular count is a tool that may allow the selection of more precocious Bradford heifers at weaning. *Theriogenology*, 119, 35-42.

Santos, GM; Silva-Santos, KC; Barreiros, TR; Morotti, F; Sanches, BV; De Moraes, FL; Blaschi, W; Seneda, MM. 2016. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. *Anim Reprod Sci*, 165:17-21.

Schoenemann, H; Humphrey; Crowder, M. 1985. Pituitary luteinizing hormone releasing receptors in ovariectomized cows after challenge with ovarian steroids. *Biology of Reproduction*, 32: 574-583.

- Shapiro, S y Wilk, M (1965). Un análisis de prueba de varianza para la normalidad (muestras completas). *Biometrika*, 52 (3–4), 591–611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>
- Shaw, M; Stanczyk, Z; Egleston, L; Kahle, L; Spittle, S; Godwin, K; Dorgan, F. 2011. Serum antimüllerian hormone in healthy premenopausal women. *Fertility and sterility*, 95(8), 2718-2721.
- Silva-Santos, KC; Santos, GM; Koetz Júnior, C; Morotti, F; Siloto, LS; Marcantonio, TN; Urbano, MR; Oliveira, RL; Lima, DC; Seneda, MM. 2014. Antral follicle populations and embryo production - in vitro and in vivo - of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. *Reprod Domest Anim*, 49:228-232.
- Silva-Santos, KC; Seneda, MM; De Andrade; Melo-Sterza, F. 2015. Antral follicles population in heifers and cows of Nelore and Girolando breeds. *Semina: Ciênc Agrár*, 36:3741-3750
- Singh, J; Domínguez, M; Jaiswal, R; Adams, GP. 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology*, 62(1-2), 227-243.
- Skinner, M. 2005. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction*, 11 (5), 461-471. Recuperado de <http://humupd.oxfordjournals.org/content/11/5/461.abstract>.
- Souza, AH; Carvalho, PD; Rosner, AE; Vieira, LM; Hackbart, KS; Bender, RW; Dresch, AR; Verstegen, JP; Shaver, RD; Wiltbank, MC. 2015. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 98:169-178.
- Stringfellow, D; Seidel, G. 2000. *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 3rd Ed. IETS. Illinois, EUA. Pp. 181.
- Tessaro, I; Luciano, AM; Franciosi, F; Lodde, V; Corbani, D; Modina, SC. 2011. The endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide system is involved in the defective quality of bovine oocytes from low mid-antral follicle count ovaries. *J. Anim. Sci.* 89, 2389–2396.

Voss, JL; Mckinnon, AO. 1993. Equine reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 622-625.

Weenen, C; Laven, JS; Von Bergh, AR; Cranfield, M; Groome, NP; Visser, JA; Themmen, AP. 2004. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 10(2), 77-83.

Wezel, IL; Rodgers, RJ. 1996. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biology of Reproduction*, (55), 1003-1011. Recuperado de <http://www.bioreprod.org/content/55/5/1003.full.pdf>.

Yang, MY; Fortune, JE. 2008. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biol. Reprod.* 78, 1153–1161.

Zacarias, TA; Kawamoto, TS; Scaliante, JR; Guimarães, AL; Franco, MM; Figueiredo, RA. 2018. Hormonal Stimulation In 4 to 7 Months Old Nelore (*Bos taurus indicus*) Females Improved Ovarian Follicular Responses But Not The In Vitro Embryo Production. *Theriogenology*, doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.05.039.

Zangirolamo, AF; Morotti, F; Da Silva, NC; Sanches, TK; Seneda, MM. 2018. Ovarian antral follicle populations and embryo production in cattle. *Anim. Reprod.* 15(3), 310-315.

## VIII. ANEXOS

**Anexo 1. Resumen descriptivo de las variables niveles de hormona antimülleriana (pg/ml), número de folículos, tamaño del cuerpo lúteo (mm) y tamaño de ovarios (cm) de hembras bovinas raza Brahman.**

Variable	N	Media	Mediana	Primer cuartil	Tercer cuartil	Desv. estándar	Coef. de variación	P Prueba Shapiro-Wilks	F Prueba de Bartlett
AMH (pg/ml)	60	297,25	250,65	197,4	310,4	185,65	62,46	0,038*	3,18*
Folículos pequeños (ud)	60	20,68	18,50	13	27	10,24	49,50	0,091 ns	1,28 ns
Folículos grandes (ud)	60	14,22	13,00	11	18	5,16	36,29	0,055 ns	1,76 ns
Folículos Totales (ud)	60	34,88	34,00	24	42	13,89	39,83	0,170 ns	1,21 ns
Cuerpo lúteo (mm)	41	13,66	13,80	12	15	3,30	24,14	0,179 ns	2,64 ns
Ovario derecho (cm)	59	2,82	2,80	2,4	3,1	0,46	16,44	0,095 ns	0,91 ns
Ovario izquierdo (cm)	59	2,79	2,72	2,25	3,37	0,64	23,10	0,085 ns	1,48 ns

**Anexo 2. Resumen del análisis de varianza para las variables número de folículos; tamaño del cuerpo lúteo (mm) y tamaño de ovarios (cm), para la dinámica folicular de hembras bovinas raza Brahman.**

Fuente de variación	Gl	Cuadrados Medios					
		Numero de folículos			Tamaño cuerpo lúteo (mm)	Tamaño ovarios (cm)	
		Pequeños	Grandes	Totales		Derecho	Izquierdo
Categoría	1	110,08ns	2,61ns	143,97 ns	21,92 ns	0,15ns	0,07ns
Rango AMH	2	1572,29**	99,94*	892,49 **	25,36 ns	0,64ns	0,32ns
Categoría*	2	72,12ns	20,03ns	16,94 ns	6,15 ns	0,02ns	0,05ns
Rango AMH							
Error	54	133,48	23,01	71,60	9,50	0,204	0,440
Coefficiente de variación (%)		23,18	23,62	28,64	15,80	11,18	16,64

Gl=Grados de libertad; \*Significativo ( $p \leq 0,05$ ); \*\*Altamente significativo ( $p \leq 0,01$ ); ns=no significativo.

**Anexo 3. Resumen descriptivo de las variables niveles de hormona antimülleriana (pg/ml), número de estructuras embrionarias, número de embriones viables, degenerados e infertilizados, número de cuerpos lúteos, folículos anovulatorios, estructuras ováricas y tasa de recuperación de embriones.**

Variable	n	Media	Mediana	Primer cuartil	Tercer cuartil	Desv. estándar	Coef. de variación	P Prueba Shapiro-Wilks	F Prueba de Bartlett
AMH (pg/ml)	21	276,12	251,9	193,5	314,3	119,93	43,43	0,3725 ns	1,825 ns
Estructuras embrionarias (ud)	21	9,43	8	6	11	6,71	71,19	0,0432 *	0,536 ns
Embriones viables (ud)	21	3,81	3	1	5	3,63	95,23	0,1146 ns	2,585 ns
Embriones degenerados (ud)	21	1,81	0	0	1	4,49	248,14	0,0801 ns	0,574 ns
Embriones infertilizados (ud)	21	3,81	1	0	5	5,31	139,3	0,0741 ns	1,203 ns
Cuerpos lúteos (ud)	21	11,76	11	8	15	5,94	50,51	0,0486*	6,450 *
Folículos anovulatorios (ud)	21	5,05	4	2	5	5,18	102,65	0,0001**	8,968 *
Estructuras ováricas (ud)	21	16,81	15	12	20	6,23	37,09	0,0299*	1,412 ns
Recuperación embriones (%)	21	74,43	90,91	53,33	100	31,3	42,05	0,0001**	2,227 ns

**Anexo 4. Resumen del análisis de varianza para las variables cuerpos lúteos, folículos anovulatorios y estructuras ováricas en hembras Brahman.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios		
		Cuerpos lúteos &	Folículos & anovulatorios	Estructuras ováricas &
Categorías	1	2,457*	1,099	0,558
Rango AMH	2	0,766	1,711	2,010**
Categoría * Rango AMH	2	0,384	0,581	0,058
Error	15	0,571	0,732	0,312
Coefficiente de variación (%)		31,31	11,96	19,97

& = Datos transformados  $(X+1)^{0,5}$ . \*Significativo ( $p \leq 0,05$ ); \*\*Altamente significativo ( $p \leq 0,01$ ); ns= no significativo.

**Anexo 5. Resumen del análisis de varianza para las variables estructuras embrionarias, embriones viables, degenerados e Infertilizados, y tasa de recuperación embriones en la raza Brahman.**

Fuente de variación	Gl	Cuadrados Medios				Tasa de recuperación embriones &&
		Estructuras & embrionarias	Viables	Embriones & Degenerados	Infertilizados	
Categorías	1	1,855	0,492	0,159	3,524	29,304
Rango AMH	2	1,616	4,417**	0,062	0,655	1160,026
Categoría * Rango AMH	2	0,955	0,302	0,352	0,143	543,859
Error	15	0,960	0,192	1,020	1,258	691,857
Coefficiente de variación (%)		18,55	17,71	12,17	38,49	7,32

& = Datos transformados  $(X+1)^{0,5}$ . && = Datos transformados  $\text{ArcSeno}(X)$ .

\*Significativo ( $p \leq 0,05$ ); \*\*Altamente significativo ( $p \leq 0,01$ ); ns= no significativo.

**Anexo 6. Protocolo de superovulación para donantes (Vaquillas).**

Día	Fecha	Hora	Tratamiento	Folltropin	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 30mg	1,5ml	
		18:00hs	FSH 30mg	1,5ml	
5	Lunes 26-3-18	6:00hs	FSH 20mg	1 ml	
		18:00hs	FSH 20mg	1 ml	
6	Martes 27-3-18	6:00hs	FSH 20mg + PGF 2ml	1 ml	
		18:00hs	FSH 20mg + RETIRO D.I.B + PGF-2ml	1 ml	
7	Miércoles 28-3-18	6:00hs	FSH 10mg	0,5 ml	
		18:00hs	FSH 10mg	0,5 ml	
8	Jueves 29-3-18	6:00hs	Celo e I.A		
		18:00hs	I.A GnRH 100 µg gonadorelin 2ml		
9	Viernes 30-3-18	6:00hs	I.A		
15	Jueves 5-4-18	6:00hs	Colecta de embriones		

## Anexo 7. Protocolo de superovulación para donadoras (Vacas)

Día	Fecha	Hora	Tratamiento	Folltropin	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 50mg	2,5ml	
		18:00hs	FSH 50mg	2,5ml	
5	Lunes 26-3-18	6:00hs	FSH 40mg	2 ml	
		18:00hs	FSH 40mg	2 ml	
6	Martes 27-3-18	6:00hs	FSH 20mg + PGF 2ml	1 ml	
		18:00hs	FSH 20mg + RETIRO D.I.B + PGF-2ml	1 ml	
7	Miércoles 28-3-18	6:00hs	FSH 10mg	0,5 ml	
		18:00hs	FSH 10mg	0,5 ml	
8	Jueves 29-3-18	6:00hs	GnRH 100 µg gonadorelin 2ml		
		18:00hs	I.A		
9	Viernes 30-3-18	6:00hs	I.A		
15	Jueves 5-4-18	6:00hs	Colecta de embriones		

## Anexo 8. Embriones bovinos: desarrollo embrionario y calidad 1 - 5



**Fuente:** (Stringfellow y Seidel, 2000) IETS

## Anexo 9. Embriones bovinos: Desarrollo embrionario y calidad 5 -9



Cycle Day: 7  
Stage Code: 5  
Quality Code: 2



Cycle Day: 7  
Stage Code: 5  
Quality Code: 1



Cycle Day: 7  
Stage Code: 5  
Quality Code: 2



Cycle Day: 7.5  
Stage Code: 5  
Quality Code: 1



Cycle Day: 7.5  
Stage Code: 6  
Quality Code: 1



Cycle Day: 7.5  
Stage Code: 6  
Quality Code: 1



Cycle Day: 8  
Stage Code: 8  
Quality Code: 1



Cycle Day: 8  
Stage Code: 8  
Quality Code: 1



Cycle Day: 9  
Stage Code: 9  
Quality Code: 1

**Fuente:** (Stringfellow y Seidel, 2000) (IETS)