

Relación entre la hormona antimülleriana y la reserva ovárica en vacas donadoras Brahman y Blanco Orejinegro

Relationship between anti-müllerian hormone and ovarian reserve in Brahman and Blanco Orejinegro donor cows

Diego A. Riveros Pinilla^{1,2,4}, Diana P. Barajas Pardo², Jorge Luis Parra Arango¹, Agustín Góngora Orjuela¹, Fabián Rueda³, Miguel A. Peña Joya¹

RESUMEN

El objetivo del estudio fue comparar los niveles de la hormona antimülleriana (AMH) en hembras Brahman y Blanco Orejinegro donadoras de ovocitos y su relación con la reserva ovárica y producción de embriones *in vitro*. Se obtuvieron ovocitos de 42 hembras Brahman y 38 Blanco Orejinegro mediante punción ovárica guiada por ultrasonido (OPU). Se colectaron muestras de sangre previo a la OPU para la determinación de las concentraciones séricas de AMH. Los ovocitos y embriones se cultivaron de manera individual para cada donante. Los resultados mostraron que las concentraciones séricas de AMH fueron de 0.78 ± 0.34 ng/ml (0.09-1.89 ng/ml) para las vacas Brahman y de 0.72 ± 0.32 ng/ml (0.13-1.19 ng/ml) para las Blanco Orejinegro. La correlación entre la concentración de AMH y el número de folículos fue de $r=0.77$ y $r=0.74$ para las vacas Brahman y Blanco Orejinegro, respectivamente, así como una correlación positiva entre la concentración de AMH y el número de blastocistos ($r=0.55$ y $r=0.6$, respectivamente). Se concluye que las donantes Brahman poseen una mayor concentración de AMH y una mayor reserva ovárica que las donantes Blanco Orejinegro; sin embargo, se encontró una mayor correlación entre la concentración de AMH y el número de blastocistos en las donantes Blanco Orejinegro que en las Brahman.

Palabra clave: blastocistos, cebú, fertilidad, hormonas, raza criolla, reproducción

¹ Grupo de Investigación en Reproducción y Genética Animal GIRGA, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colombia

³ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA Bogotá, Colombia

⁴ E-mail: diego.riveros@unillanos.edu.co

Recibido: 10 de agosto de 2021

Aceptado para publicación: 16 de mayo de 2022

Publicado: 31 de agosto de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the levels of anti-Müllerian hormone (AMH) in female Brahman and Blanco Orejinegro oocyte donors and its relationship with ovarian reserve and embryo production *in vitro*. Oocytes were obtained from 42 Brahman and 38 Blanco Orejinegro females by ultrasound-guided ovarian puncture (OPU). Blood samples were collected prior to OPU for determination of serum AMH concentrations. The oocytes and embryos were cultured individually for each donor. The results showed that serum AMH concentrations were 0.78 ± 0.34 ng/ml (0.09-1.89 ng/ml) for Brahman cows and 0.72 ± 0.32 ng/ml (0.13-1.19 ng/ml) for Blanco Orejinegro cows. The correlation between the concentration of AMH and the number of follicles was $r=0.77$ and $r=0.74$ for the Brahman and Blanco Orejinegro cows, respectively, as well as a positive correlation between the concentration of AMH and the number of blastocysts ($r=0.55$ and $r=0.6$, respectively). It is concluded that the Brahman donors have a higher concentration of AMH and a greater ovarian reserve than the Blanco Orejinegro donors; however, a higher correlation was found between the concentration of AMH and the number of blastocysts in Blanco Orejinegro donors than in Brahman.

Key words: blastocysts, zebu, fertility, hormones, creole breed, reproduction

INTRODUCCIÓN

El éxito de las herramientas de biotecnología reproductiva como la transferencia de embriones depende en parte de la calidad de los ovocitos y de la reserva ovárica (RO) que puedan tener las hembras donantes (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2007, 2011; Pontes *et al.*, 2011). Durante la vida fetal, las células somáticas rodean a las células germinales del ovario y forman los folículos primordiales. Este grupo de folículos serán los que acompañen a la hembra durante toda su vida reproductiva (Erickson, 1966). Al nacer, la hembra bovina cuenta con un rango entre 10 000 a 350 000 folículos, pero esta RO va decreciendo progresivamente y al llegar a la pubertad (12 meses) contará con 1920 a 40 960 folículos (Ireland *et al.*, 2008). Estos folículos primordiales serán los que darán lugar a la población de folículos en crecimiento (Scaramuzzi *et al.*, 2011).

Se ha determinado que un buen predictor de la RO es el Conteo de Folículos Antrales (CFA) mediante ultrasonido en la fase

folicular temprana (Alvarez *et al.*, 2000). Sin embargo, hay marcadores fisiológicos que pueden predecir la RO en cualquier momento del ciclo estral, como es el caso de la hormona Anti-Mülleriana (AMH), la cual refleja el número de folículos que han hecho la transición de folículo primordial a folículo en crecimiento y que además es independiente del control gonadotrófico (Visser *et al.*, 2006). En las hembras, la AMH se expresa en forma exclusiva en las gónadas y se produce a partir del nacimiento (Durlinger *et al.*, 2002) dentro de las células de la granulosa de los folículos antrales en crecimiento y se reduce durante el crecimiento folicular terminal (Rico *et al.*, 2011; Monniaux *et al.*, 2013). Adicionalmente, la AMH ha demostrado ser un modulador del crecimiento folicular temprano, que actúa como un factor para prevenir el agotamiento prematuro de la RO (Durlinger *et al.*, 2002). Esta última característica fisiológica es la que se ha propuesto como principal marcador biológico de la RO en comparación con otras hormonas (Monniaux *et al.*, 2013). Asimismo, las concentraciones circulantes de AMH han sido asociadas positivamente con la RO en ganado taurino e índico (Batista *et al.*, 2014).

Diversos estudios han estudiado marcadores fisiológicos que puedan predecir la RO en bovinos de varias razas (Batista *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2014), pero no han incluido a hembras Brahman y Blanco Orejinegro criadas bajo las condiciones de Colombia. Ante esto, el objetivo del estudio fue comparar los niveles de la hormona anti-Mülleriana de hembras Brahman y Blanco Orejinegro donadoras de ovocitos y establecer su relación con la reserva ovárica y producción de embriones *in vitro* en condiciones del trópico bajo colombiano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y Animales

El presente estudio se desarrolló en la central de reproducción y genética EMBRIOVET SAS ubicada en la Hacienda «La Marina», en el municipio de San Martín, Meta, Colombia. La zona se encuentra a una altitud de 372 msnm, presenta una temperatura anual promedio de 26.9 ± 3.0 °C y una precipitación pluviométrica anual de 2832 mm. Se utilizaron 80 vacas, 38 Blanco Orejinegro (BON) (*Bos taurus*) y 42 Brahman (*Bos indicus*). Todas las vacas se encontraron en etapa reproductiva, en buen estado de salud y eran mantenidas en pastoreo rotacional con pasturas de *Brachiaria dictyoneura* y *Brachiaria humidicola*, sal mineralizada y agua a voluntad. Todas las hembras contaban con registro de Asocebú y Asocriollanos. Al momento de los procedimientos experimentales tenían más de 90 días de posparto, evaluación reproductiva normal, no gestantes, y sin patologías ováricas.

Hormona anti-Mülleriana (AMH)

Se tomaron muestras de sangre (4 ml) mediante venopunción coccígea en tubos con EDTA como anticoagulante. El suero se obtuvo mediante centrifugación y se mantuvo

congelado a -80 °C, hasta su uso en el laboratorio. La muestra de sangre se colectó previo a la punción ovárica guiada por ultrasonido (OPU). La concentración de AMH se determinó utilizando un kit comercial de ELISA (Bovine AMH ELISA AL-114; Ansh Labs, USA), kit con sensibilidad de 0.1 ng/ml y límite de detección de <0.078 ng/ml. La lectura se hizo en un lector de microplacas (Bio-Tek EON; Biotek Instruments, USA). El análisis hormonal se realizó en el Laboratorio de Reproducción y Genética de la Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia.

Ultrasonografía y OPU

La OPU se realizó sin previa sincronización de la onda folicular. Previo a la OPU se hizo el recuento de los folículos antrales mayores de 2 mm en ambos ovarios utilizando un ecógrafo Mindray DP-50 Vet (Mindray Bio-Medical Electronics, China) con una sonda transrectal convexa de 5 MHz. Las vacas donantes se clasificaron de acuerdo con el valor de CFA y el nivel de AMH en tres grupos: alto, intermedio y bajo.

Las donantes fueron sujetadas en un brete y se les aplicó anestesia epidural (2% de lidocaína, 5 ml) para facilitar el manejo de los ovarios a través del recto. Se limpió y desinfectó la zona perianal con alcohol etílico al 70%. Se aspiraron todos los folículos visibles por medio de una aguja de aspiración (20 G; Terumo Europe, Bélgica) instalada dentro de la sonda transvaginal y conectada al sistema de vacío (85-90 mmHg de presión de vacío negativo (K-MAR 5000 Cook Medical, Australia). El líquido folicular fue conducido mediante un circuito de manguera con diámetro interno de 1.1 mm y 120 cm de largo (Watanabe Tecnología Aplicada, Brasil) conectado directamente a un tubo cónico de 50 ml que contenía 15 ml de solución salina fosfato tampón Dulbecco DPBS (Sigma) y 5000 IU/ml heparina sódica, mantenido a 37 °C.

Clasificación de Complejos Cumulus Ovocitos (COCs)

Los ovocitos fueron clasificados según la apariencia de las células del cumulus oophorus y del ovoplasma, observados bajo estereoscopio, según protocolo de Leibfried y First (1979): Categoría 1. Mínimo tres capas compactas y homogéneas del cumulus que lo rodean completamente, con ovoplasma granulado que llena la totalidad del ovocito bordeando la zona pelúcida; Categoría 2. Tres capas del cumulus rodean el ovocito parcialmente, con ovoplasma heterogéneo granulado dejando ver zonas claras y oscuras; Categoría 3. Las células de cumulus están expandidas, el ovoplasma no llena en su totalidad el ovocito, el cual se presenta fragmentado y con presencia de vacuolas; Categoría 4: ovocitos desnudos. Los ovocitos tipo 1 y 2 se seleccionaron para maduración *in vitro* y fecundación *in vitro*.

Maduración, Fertilización *in vitro* y Cultivo de Embriones

Los ovocitos y embriones se cultivaron en todos los procesos de manera individual para cada donante y se llevaron a los procesos de maduración *in vitro*, fertilización *in vitro* y cultivo de embriones *in vitro* de acuerdo con los protocolos del laboratorio comercial con medios de cultivo (Vitrogen, Brasil) para cada etapa del proceso. El semen para la fertilización se utilizó de acuerdo con los requerimientos de los clientes de la central genética EMBRIOVET.

Grupos de 10 COCs seleccionados fueron madurados en 100 μ l en medio MIV, cubierto con aceite mineral a 39 °C en una atmosfera humidificada con 5% de CO₂ por 24 h. Luego de la maduración *in vitro*, los COCs fueron lavados y transferidos a 100 μ l de medio FIV cubierto con aceite mineral. Se utilizó semen convencional congelado de toros con fertilidad probada, descongelados a 35 °C por 30 s y seleccionados por centrifugación (2 min x 7000 rpm) sobre gradientes de Percoll discontinuos (45 y 90%).

El pellet fue reconstituido en 1000 μ l del medio FIV y nuevamente centrifugado (45 s x 3000 rpm). El pellet fue diluido con medio FIV a una concentración de 2 x 10⁶ espermatozoides/ml y 5 μ l de esta dilución fue adicionada a las gotas de fertilización. Los gametos se coincubaron durante 21 h a 39 °C en atmosfera humidificada con 5% de CO₂, los presuntos cigotos fueron lavados en medio CIV, desnudándolos por pipeteo suave y distribuyéndolos aleatoriamente (10 por gota de 100 μ l de medio CIV). Los cigotos se incubaron a 39 °C en atmosfera humidificada con 5% de CO₂. Durante los días 3 y 6 de cultivo, el 50% del medio CIV fue cambiado por medio fresco. En el día 7 se registró la producción de blastocistos.

Los embriones fueron clasificados por grados, bajo microscopio estereoscopio, de acuerdo con la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) (Wright, 1998).

Análisis Estadístico

Los datos fueron sometidos a estadística descriptiva y expresada como media \pm error estándar de la media (SEM), a excepción de la correlación de Pearson. Se utilizó el análisis de varianza seguido de la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.001$) para determinar diferencias para las variables concentración de AMH, número de folículos y número de blastocistos. Todos los valores fueron probados para la distribución normal, utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos fueron analizados con el software Epidat 4.1.

RESULTADOS

La media de las concentraciones séricas de AMH de las vacas Brahman fue de 0.78 \pm 0.34 ng/ml (0.09-1.89 ng/ml), en tanto que en las vacas Blanco Orejinegro fue de 0.72 \pm 0.32 ng/ml (0.13-1.19 ng/ml). Los valores según los niveles de AMH baja, intermedia y alta se presentan en el Cuadro 1. 1; asimis-

Cuadro 1. Niveles de concentración sérica de la hormona anti-Mülleriana (AMH) en vacas Brahman (n=42) y Blanco Orejinegro (n=38)

	Brahman		Blanco Orejinegro	
	Promedio	Rango	Promedio	Rango
Alta	1.52	1.14-1.89	1.04	0.92-1.19
Intermedia	0.81	0.46-1.13	0.76	0.50-0.91
Baja	0.23	0.09-0.45	0.31	0.13-0.49

Cuadro 2. Número de folículos encontrados por ultrasonografía en vacas Brahman (n=42) y Blanco Orejinegro (n=38) con tres niveles de hormona anti-Mülleriana (AMH)

AMH	Folículos (n)		Valor p
	Brahman	Blanco Orejinegro	
Alta	36.40 ± 5.94	18.3 ± 4.94	0.001
Intermedia	23.60 ± 4.30	11.6 ± 4.60	
Baja	4.20 ± 3.30	5.25 ± 4.36	

mo, se presentan los rangos de valores para las tres categorías para cada una de las razas. Por otro lado, los resultados evidenciaron que el total de folículos en vacas con AMH alta fue significativamente superior ($p < 0.001$) en ambas razas en comparación con los folículos detectados en vacas con AMH intermedia o baja. Asimismo, el número de folículos en las vacas Brahman fue significativamente mayor al detectado en hembras Blanco Orejinegro (Cuadro 2).

La correlación de Pearson demostró una correlación altamente significativa entre la concentración de AMH y el número de folículos en las vacas Brahman ($r = 0.76$, $p < 0.001$) y una correlación significativa, aunque menor con el número de blastocistos ($r = 0.55$, $p < 0.001$) (Figura 1). En el caso de las vacas Blanco Orejinegro, la correlación entre la concentración de AMH y el número

de folículos fue similar a la observada en vacas Brahman ($r = 0.74$, $p < 0.001$), pero la correlación fue mayor con el número de blastocistos ($r = 0.66$, $p < 0.001$) (Figura 2).

DISCUSIÓN

El número de folículos antrales es una característica importante, ya que es un indicador del potencial de producción de embriones *in vitro* en una hembra donante. En este estudio se encontró una correlación alta entre el número de folículos y las concentraciones de AMH en ambas razas, así como un mayor número de folículos antrales ováricos en vacas Brahman que en Blanco Orejinegro, diferencia similar a reportes de otros estudios con diferentes grupos genéticos (Álvarez *et al.*, 2000; Guerreiro y Batista, 2014).

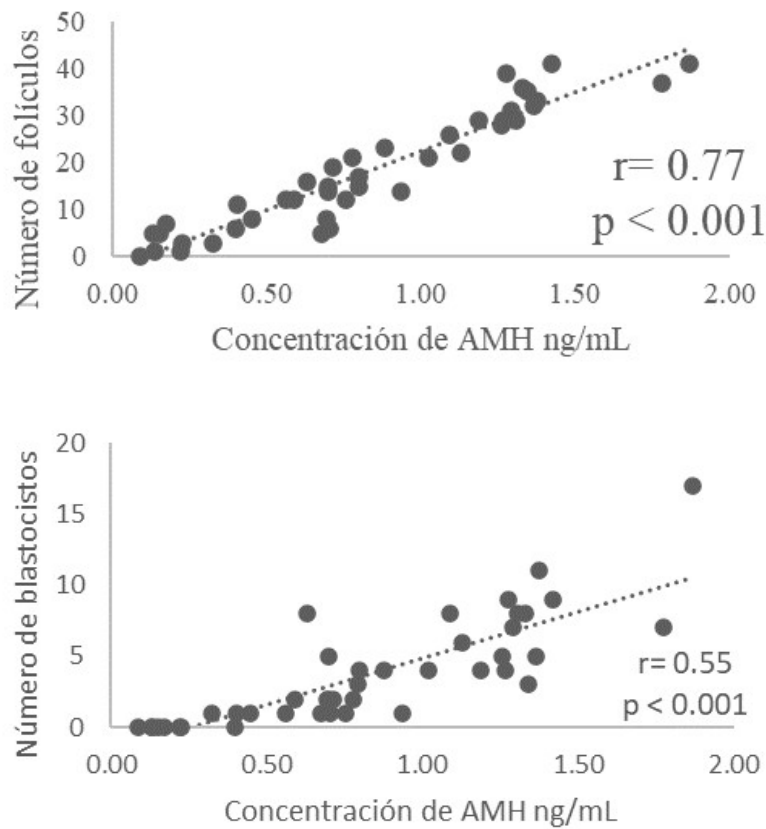


Figura 1. Relación entre las concentraciones de hormona anti-Mülleriana (AMH) de vacas hembras Brahman con el número de folículos antrales detectados (figura superior) y con el número de blastocistos desarrollados después la fertilización *in vitro*

Se tienen reportes de mediciones de las concentraciones de AMH circulante en varias razas bovinas y en algunas otras especies de interés zootécnico. Así, Maculan *et al.* (2018) reportan valores promedio de 1.60 ng/ml (0.014-4.516 ng/ml) en vacas Tabapua (*Bos indicus*) y una correlación positiva entre la concentración de AMH circulante y el número de folículos antrales observados. Las correlaciones encontradas en el presente estudio corroboran esta relación entre la RO y las concentraciones de AMH. Por otro lado, los mayores niveles de AMH en *Bos indicus* con relación al *Bos taurus* encontrados en el presente estudio es similar al estudio de Baldrighi *et al.* (2014) quienes compararon

las concentraciones de AMH del Gyr (0.60 ± 0.09 ng/ml) con las del Holstein (0.24 ± 0.08 ng/ml).

Los resultados de este trabajo brindan evidencia de la existencia de una correlación positiva entre la concentración sérica de AMH y el número de folículos antrales en hembras bovinas donantes de ovocitos de la raza Brahman y Blanco Orejinegro. Los resultados sugieren que la AMH podría ser un posible marcador fisiológico en estas razas para predecir el número relativo de folículos que contribuyan al momento de seleccionar hembras bovinas para su empleo en biotecnologías reproductivas como la aspiración

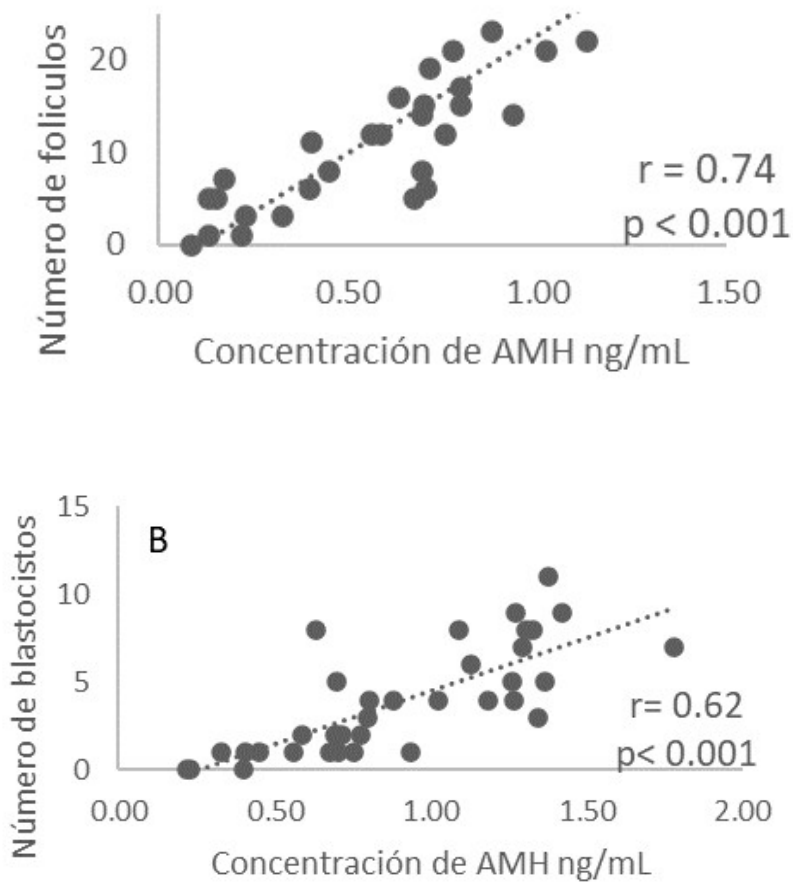


Figura 2. Relación entre las concentraciones de hormona anti-Mülleriana (AMH) de vacas hembras Blanco Orejinegro con el número de folículos antrales detectados (figura superior) y con el número de blastocistos desarrollados después la fertilización *in vitro*

folicular y la producción de embriones *in vitro*, tal como ha sido observado por Ireland *et al.* (2008). De manera general, los resultados de este estudio coinciden con los reportados en la literatura para otras razas de bovinos y bufalinos que han demostrado la relación directa de la hormona AMH con la FSH, de tal manera que la AMH afecta el desarrollo de la dinámica folicular, evidenciándose una correlación positiva entre el conteo de folículos antrales y la concentración en la sangre (Maculan *et al.*, 2018; Ramírez, 2019)

La correlación positiva entre las concentraciones sanguíneas de AMH y el número de embriones (blastocistos) en las vacas donantes de las dos razas en el presente estudio coincide con lo observado por Monniaux *et al.* (2010). La asignación de las vacas donantes a los tres grupos según la concentración de AMH puso en evidencia que las vacas con concentraciones séricas de AMH mayores a 0.10 ng/ml produjeron mayor cantidad de embriones transferibles que las vacas con valores menores a 0.01 ng/ml

de AMH. Asimismo, Batista *et al.* (2014) encontraron una correlación positiva similar en terneras Nelore donantes con un coeficiente de correlación ($r=0.62$) muy semejante al que presentaron las donantes Blanco Orejinegro en este trabajo.

Los resultados del presente estudio y los hallados en la literatura científica sobre la concentración de AMH en sangre son consistentes en cuanto a su posible función como indicador de reserva ovárica. Adicionalmente, las concentraciones de AMH permanecen constantes a través de todas las fases del ciclo estral y no parece que sean afectadas por los protocolos de sincronización hormonal (Guerreiro *et al.*, 2014; Pfeiffer y Jury, 2014). La determinación de los valores de AMH es una ventaja que podría aprovecharse para el desarrollo y optimización de protocolos destinados a una mayor obtención de ovocitos por aspiración.

CONCLUSIONES

- Se logró establecer la relación entre los niveles de la hormona anti-Muelleriana (AMH) y algunos parámetros de calidad en hembras donadoras de ovocitos de las razas Brahman y Blanco Orejinegro.
- La AMH podría ser un marcador endocrino satisfactorio de reserva ovárica tanto en bovinos Brahman y Blanco Orejinegro.

Agradecimientos

A la empresa EMBRIOVET SAS por brindar la logística que permitió llevar a cabo las diferentes fases de este proyecto de investigación.

LITERATURA CITADA

1. **Alvarez P, Spicer L, Chase C, Payton M, Hamilton T, Stewart E, Hammond A, Olson TA, et al. 2000.** Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *J Anim Sci* 78: 1291-1302. doi: 10.2527/2000.7851291x
2. **Baldrighi Jm, Sá Filho MF, Batista EO, Lopes RN, Visintin JA, Baruselli PS, Assumpção ME. 2014.** Anti-Mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. *Reprod Domest Anim* 49: 1015-1020. doi: 10.1111/rda.12430
3. **Batista EO, Macedo GG, Sala RV, Ortolan MD, Sá Filho MF, Del Valle TA, Jesus EF, et al.** Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. *Reprod Domest Anim* 49: 448-452. doi: 10.1111/rda.12304
4. **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. doi: 10.1095/biolreprod.104.036277
5. **Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. 2002.** Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction* 124: 601-609. doi: 10.1530/rep.0.1240601
6. **Matschke GH, Erickson BH. 1969.** Development and radioresponse of the prenatal bovine testis. *Biol Reprod* 1: 207-214. doi: 10.1095/biolreprod1.2.207
7. **Guerreiro BM, Batista EO, Vieira LM, Sá Filho MF, Rodrigues CA, Castro Netto A, Silveira CR, et al. 2014.** Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for *in vitro* embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domest Anim Endocrin* 49: 96-104. doi: 10.1016/j.domaniend.2014.07.002

8. **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. doi: 10.1093/humrep/dem071
9. **Ireland JL, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen AP, Ward F, Lonergan P, Smith GW, et al. 2008.** Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod* 79: 1219-1925. doi: 10.1095/biolreprod.108.071670
10. **Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Mossa F, et al. 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. *Reprod Fertil Dev* 23: 1-14. doi: 10.1071/RD10226
11. **Leibfried L, First NL. 1979.** Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci* 48: 76-86. doi: 10.2527/jas1979.-48176x
12. **Maculan R, Pinto TLC, Moreira GM, de Vasconcelos GL, Sanches JA, Rosa RG, de Souza JC. 2018.** Anti-Müllerian Hormone (AMH), antral follicle count (AFC), external morphometrics and fertility in Tabapuã cows. *Anim Reprod Sci* 189: 84-92. doi: 10.1016/j.anireprosci.-2017.12.011
13. **Monniaux D, Baril G, Laine AL, Jarrier P, Poulin N, Cognié J, Fabre S. 2011.** Anti-Mullerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. *Reproduction* 142: 845-854. doi: 10.1530/REP-11-0211
14. **Monniaux D, Drouilhet L, Rico C, Estienne A, Jarrier P, Touzé JL, Sapa J, et al. 2012.** Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. *Reprod Fert Develop* 25: 1-16. doi: 10.1071/RD12270
15. **Pfeiffer KE, Jury LJ, Larson JE. 2014.** Determination of anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. *Domest Anim Endocrin* 46: 58-64. doi: 10.1016/j.domaniend.2013.05.004
16. **Pontes JH, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KC, Seneda MM. 2011.** Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 75: 1640-1646. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.12.026
17. **Ramírez A. 2019.** Estandarización de la detección de la hormona antimulleriana en hembras donantes de la raza Brahman. Tesis de Médico Veterinario. Bogotá, Colombia: Univ. de La Salle. 28 p.
18. **Ribeiro ES, Bisinotto RS, Lima FS, Greco LF, Morrison A, Kumar A, Thatcher WW, et al. 2014.** Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *J Dairy Sci* 97: 6888-6900. doi: 10.3168/jds.2014-7908
19. **Rico C, Médigue C, Fabre S, Jarrier P, Bontoux M, Clément F, Monniaux D. 2011.** Regulation of anti-Müllerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. *Biol Reprod* 84: 560-571. doi: 10.1095/biolreprod.110.088187
20. **Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancourt MA, Dupont J, Fortune JE, Gilchrist RB, et al. 2011.** Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod Fert Develop* 23: 444-467. doi: 10.1071/RD09161

21. **Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP. 2006.** Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 131: 1-9. doi: 10.1530/rep.1.00529
22. **Wright JM. 1998.** Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. In: *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 3rd ed. Illinois, USA: IETS. p 167-170.