



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**La Hormona Antimülleriana como un predictor endócrino para  
estimar la producción de embriones transferibles *in vivo***

Trabajo de titulación previo a la  
obtención del título de Médico  
Veterinario Zootecnista.

**Autores:**

Andrés Santiago Jácome Aucay

CI: 0106543325

andrestvet.jacome@hotmail.com

Jeffersson Manuel Bermeo Jiménez

CI: 1900611060

Jeff.bermeo88@gmail.com

**Director:**

Luis Eduardo Ayala Guanga

CI: 0102635463

**Cuenca, Ecuador**

02-marzo-2020



## Resumen:

El presente estudio buscó establecer si la hormona Antimülleriana (AMH) sirve como un marcador endócrino confiable para estimar la producción de embriones transferibles en donadoras de raza Holstein mestiza, bajo sistemas de pastoreo sobre los 2500 msnm. La investigación se realizó en ganaderías ubicadas en las provincias de Azuay y Cañar, zona Austral del Ecuador. Un total de 36 vacas recibieron el mismo protocolo de superovulación (SOV). Al inicio del protocolo (día 0) se realizó la toma de las muestras de sangre mediante venopunción coccígea para medir los niveles plasmáticos de hormona Antimülleriana, mediante el kit DL-AMH-b (Develop®). A continuación, se efectuó el recuento de folículos antrales (RFA), mediante un ecógrafo Prosound 2, con transductor lineal, 7,5 Mhz. La valoración de la respuesta a la SOV fue ejecutada mediante conteo de folículos >8 mm presentes antes de la primera IA (día 9). El día 15 luego de la colecta de los embriones se realizó mediante ecografía el conteo del número de CL. Una vez terminado la colecta se procedió a valorar el estadio y la calidad de las estructuras recuperadas en base a los criterios de la IETS. La clasificación de los animales en grupos de alta ( $0,10 \pm 0,002$  ng/ml) y baja ( $0,05 \pm 0,05$  ng/ml) concentración de AMH, se realizó mediante terciles. No se encontró correlación entre la concentración plasmática de AMH y el RFA. Sin embargo, la correlación entre la AMH y la respuesta a la SOV fue positiva y altamente significativa ( $r=0,61$ ;  $P<0,001$ ) esto se pudo observar también con el número de cuerpos lúteos ( $r=0,46$ ;  $P<0,005$ ), el total de estructuras recuperadas ( $r=0,53$ ;  $P<0,001$ ) y el número de embriones transferibles ( $r=0,55$ ;  $P<0,001$ ). Se concluye que la AMH puede utilizarse como marcador endócrino confiable para la selección de buenas donadoras de embriones.

**Palabras claves:** Biotecnología. Holstein. Superovulación. MOET. Embriones.

**Abstract:**

The aim of the present study sought to establish whether Antimüllerian hormone (AMH) serves as a reliable marker to estimate endocrine production of transferable embryos in donors Holstein mestiza under grazing systems on 2500 masl. The research was conducted in livestock farms located in the provinces of Azuay and Cañar, Austral area of Ecuador. A total of 36 cows received the same superovulation protocol (SOV). At the beginning of the protocol (day 0), blood samples were taken by coccygeal venipuncture to measure the plasma levels of Antimüllerian hormone, using the DL-AMH-b kit (Develop®). Then the antral follicle count (AFC) was performed for ultrasound, using linear transducer Prosound 2, 7.5 MHz. The assessment of the response to the SOV was performed by counting follicles >8 mm present before the first AI (day 9). On day 15 after embryo collection, the CL number count was performed by ultrasound. Once the collection was completed, the stage and the quality of the structures recovered were assessed based on the criteria of the IETS. The animals were classified into tertiles, having groups of high ( $0.10 \pm 0.002$  ng/ml) and low ( $0.05 \pm 0.05$  ng/ml) AMH concentration. No correlation was found between the plasma concentration of AMH and the AFC. However, the correlation between AMH and the response to SOV was positive and highly significant ( $r=0.61$ ;  $P<0.001$ ). This was also observed with the number of corpus luteum ( $r= 0.46$ ;  $P<0.005$ ), the total number of structures recovered ( $r=0.53$ ;  $P<0.001$ ) and the number of transferable embryos ( $r= 0.55$ ;  $P<0.001$ ). In conclusion, AMH can be used as a reliable endocrine marker for the selection of good embryo donors.

**Keywords:** Biotechnology. Holstein. Superovulation. MOET. Embryos.



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
2.1. Objetivo general.....	19
2.2. Objetivos específicos .....	19
2.3. Hipótesis .....	19
<b>3. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	20
3.1. Generalidades de la transferencia de embriones .....	20
3.2. Multiovulación y transferencia de embriones.....	20
3.2.1. Superovulación.....	21
3.3. Factores que afectan la superovulación .....	22
3.3.1. Factores intrínsecos .....	22
3.3.2. Factores extrínsecos .....	23
3.4. Protocolos de superovulación .....	24
3.4.1. Sincronización de la onda folicular.....	25
3.5. Colección de embriones.....	28
3.5.1. Técnica no quirúrgica de recolección de embriones .....	28
3.5.2. Preparación de la donadora previo a la colección de embriones .....	29
3.5.3. Lavado de embriones .....	30
3.6. Búsqueda y evaluación de embriones.....	30
3.6.1. Etapa de desarrollo del embrión .....	31
3.6.2. Calidad del embrión.....	35
3.7. Donadoras .....	37
3.7.1. Selección de la donadora .....	37
3.7.2. Manejo de las donadoras .....	38
3.8. Recuento de folículos antrales .....	38
3.8.1. Concentración de progesterona y recuento de folículos antrales .....	39



3.8.2.	Recuento de folículos antrales y su eficiencia en la producción de embriones.....	40
3.8.3.	Recuento de folículos antrales y hormona Antimülleriana.....	41
3.9.	Hormona Antimülleriana.....	41
3.9.1.	Hormona Antimülleriana en humanos.....	42
3.9.2.	Hormona Antimülleriana en el ganado bovino.....	43
3.9.3.	Factores que afectan la AMH .....	43
3.10.	Utilidad de la Hormona Antimülleriana .....	45
3.10.1.	Hormona Antimülleriana y respuesta superovulatoria.....	45
3.10.2.	Hormona Antimülleriana y producción de embriones.....	45
3.11.	Determinación de AMH mediante test de ELISA.....	46
4.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	47
4.1.	Materiales .....	47
4.2.	Métodos .....	48
4.2.1.	Área de estudio .....	48
4.2.2.	Metodología de la investigación.....	49
5.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	54
5.1.	Resultados generales de las variables en estudio de los 36 animales ....	54
5.2.	Resultados de los grupos de alta, media y baja concentración de AMH..	55
5.3.	Recuento de Folículos Antrales.....	57
5.4.	Respuesta a la superovulación considerando el número de folículos presentes en la IA y el número de cuerpos lúteos al momento del lavado .....	58
5.5.	Recolección de embriones .....	63
6.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	68
7.	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	69
8.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	70
9.	<b>ANEXOS</b> .....	78



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Protocolos de SOV en distintas razas de ganado.....	27
<b>Figura 2:</b> Ovocito sin fecundar (UFO).....	31
<b>Figura 3:</b> Mórula temprana .....	32
<b>Figura 4:</b> Mórula .....	32
<b>Figura 5:</b> Blastocisto temprano.....	33
<b>Figura 6:</b> Blastocisto.....	33
<b>Figura 7:</b> Blastocisto expandido .....	34
<b>Figura 8:</b> Blastocisto eclosionado.....	34
<b>Figura 9:</b> Mórula de de excelente calidad.....	35
<b>Figura 10:</b> Dos mórulas de de calidad buena .....	36
<b>Figura 11:</b> Mórula de calidad regular .....	36
<b>Figura 12:</b> Embrión degenerado.....	37
<b>Figura 13:</b> Mapa de la ubicación del área de estudio .....	48
<b>Figura 14:</b> Protocolo de sincronización de la onda folicular, superovulación (SOV) y colección de embriones .....	49
<b>Figura 15:</b> Valores promedios y error estándar de la Hormona Antimülleriana en los grupos clasificados como de baja, media y alta concentración, según la concentración de AMH.....	56
<b>Figura 16:</b> Valores promedios y error estándar del recuento de folículos antrales (RFA), en los grupos clasificados como de baja, media y alta, según los valores de AMH.....	57
<b>Figura 17:</b> Valores promedios y error estándar del recuento de folículos que se encontraron al momento de la valoración de la superovulación (SOV), en los grupos clasificados como de baja, media y alta, según los valores de AMH .....	58



**Figura 18:** Valores promedios y error estándar del tamaño de los folículos que respondieron a la superovulación (SOV), en los grupos clasificados como de baja, media y alta, según los valores de AMH ..... 59

**Figura 19:** Valores promedios y error estándar del número de cuerpos lúteos que se observaron luego del proceso de superovulación (SOV), en los grupos clasificados como de baja, media y alta, según los valores de AMH ..... 60

**Figura 20:** Valores promedios y error estándar del tamaño de los cuerpos lúteos que se observaron luego del proceso de superovulación (SOV), en los grupos clasificados como de baja, media y alta, según los valores de AMH ..... 61

**Figura 21:** Valores promedios y error estándar del número de folículos que no ovularon y fueron observados en la ecografía realizada antes de la inseminación artificial, en los grupos clasificados como de baja, media y alta, según los valores de AMH..... 62

**Figura 22:** Valores promedios y error estándar del número de embriones transferibles obtenidos del proceso de superovulación (SOV), en los grupos clasificados como de baja, media y alta, según los valores de AMH ..... 64



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Descripción del desarrollo de los embriones al momento de la colecta en el día 7 .....	51
<b>Tabla 2:</b> Descripción de la calidad de los embriones .....	52
<b>Tabla 3:</b> Valores descriptivos de los niveles de Hormona Antimülleriana (AMH), el Recuento de Folículos Antrales (RFA), el número de folículos presentes en el día de valoración de la SOV (RSOV) y el número de embriones transferibles, obtenidos en los 36 animales en estudio .....	55
<b>Tabla 4:</b> Media y error estándar de los embriones obtenidos en los grupos clasificados como de baja, media y alta concentración de hormona Antimülleriana. ....	63
<b>Tabla 5:</b> Media y error estándar de la calidad de los embriones obtenidos en los grupos clasificados como de baja, media y alta concentración de hormona Antimülleriana .....	65
<b>Tabla 6:</b> Valor de correlación de Pearson entre la AMH y la respuesta a la SOV de acuerdo a los parámetros valorados en el estudio .....	67



## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Ficha de selección de donadoras.....	78
<b>Anexo 2:</b> Protocolo de SOV .....	81
<b>Anexo 3:</b> Plantilla para el análisis AMH.....	81
<b>Anexo 4:</b> Fotografías de la investigación.....	82



## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Andrés Santiago Jácome Aucay, autor del trabajo de titulación “**La Hormona Antimülleriana como un predictor endócrino para estimar la producción de embriones transferibles *in vivo***”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 02 de marzo de 2020.

---

Andrés Santiago Jácome Aucay

C.I: 0106543325



## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Jeffersson Manuel Bermeo Jiménez, autor del trabajo de titulación “**La Hormona Antimülleriana como un predictor endócrino para estimar la producción de embriones transferibles *in vivo***”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 02 de marzo de 2020.

---

Jeffersson Manuel Bermeo Jiménez

C.I: 1900611060



## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Andrés Santiago Jácome Aucay en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “**La Hormona Antimülleriana como un predictor endócrino para estimar la producción de embriones transferibles *in vivo***”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 02 de marzo de 2020.

Andrés Santiago Jácome Aucay

C.I: 0106543325



## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Jefferson Manuel Bermeo Jiménez en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **“La Hormona Antimülleriana como un predictor endócrino para estimar la producción de embriones transferibles *in vivo*”**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 02 de marzo de 2020.

---

Jeffersson Manuel Bermeo Jiménez

C.I: 1900611060



## **AGRADECIMIENTOS.**

Agradezco a mis padres por su paciencia, enseñanzas y sobre todo por el apoyo incondicional que me han brindado durante todas las etapas de mi vida, ya que sin ellos no hubiera logrado cumplir mis sueños.

A mi familia por estar presentes en los buenos y malos momentos, que me han ayudado a forjarme como persona de bien.

A mis amigos, que me han permitido compartir experiencias llenas de logros y desilusiones, pero siempre con ellos fueron las mejores.

Andrés Jácome.

Gracias a mis padres, por su apoyo y dedicación para llegar a superar cada desafío que se me ha presentado a lo largo de mi vida.

A mi familia por creer en mí, y darme sus palabras de aliento para no decaer cuando todo parecía complicado.

Especial gratitud a mis amigos y compañeros por cada risa y cada experiencia que hemos llegado a compartir a lo largo de nuestra vida universitaria.

Jeffersson Bermeo.



## AGRADECIMIENTOS.

Queremos hacer un extenso agradecimiento a nuestro, director, profesor y amigo, Dr. Luis Ayala por el tiempo, paciencia y dedicación, quien de manera desinteresada logró guiarnos por el apasionante mundo la biotecnología de la reproducción.

A los miembros del proyecto de investigación: “Rol de la hormona Antimülleriana para predecir la disponibilidad de folículos en vacas, que respondan a la superovulación y generen ovocitos o embriones competentes *in vivo* e *in vitro*” quienes gracias a ellos pudimos realizar nuestra tesis.

Al Dr. José Luis Pesantez y al Dr. Antonio Vallecillo por la participación activa y generosa a lo largo del desarrollo de nuestro trabajo.

A los miembros del laboratorio de biotecnología y reproducción animal de la universidad de Cuenca. Quienes nos brindaron todas las facilidades y ayuda para poder desarrollar de la mejor manera nuestra investigación. En especial al Dr. Rafael Ochoa y Dr. Jonnathan Alvarado.

Al Dr. Daniel Argudo, docente de la Universidad Católica de Cuenca, quien nos supo brindar sus conocimientos para poder desarrollar los procedimientos prácticos de la tesis.

A los ganaderos, quienes sin su confianza este trabajo no hubiera sido posible.

Andrés Jácome y Jeffersson Bermeo.



## DEDICATORIA.

A mis padres, Wilson y Teresa.

Al cumplir el sueño que estará presente desde este momento en adelante, quiero dejar plasmado todo mi amor y respeto hacia ellos.

Andrés.

A mis padres, mis hermanas y mis abuelas, por guiarme en este camino y ayudarme a crecer cada día como persona de bien.

Jeffersson.



## 1. INTRODUCCIÓN.

La multiovulación y transferencia de embriones (MOET) es una técnica reproductiva, utilizada desde la década de los años 70 (Hasler, 2014). En el año 2014 se llegó a producir 620.000 embriones transferibles *in vivo* a nivel mundial (IETS, 2015). Si bien esta biotecnología ha permitido aumentar el número de animales genéticamente superiores, no es menos cierto que en los últimos 35 años los resultados no han mejorado (G. Bó & Mapletoft, 2014).

La baja respuesta a la superovulación (SOV) a decir de varios investigadores está relacionada con factores dependientes al animal como subespecie, raza, estado nutricional, momento del ciclo estral, o aquellos externos como tipo de hormona utilizada, dosis, duración del tratamiento y los factores medioambientales (Mapletoft *et al.*, 2002). Sin embargo, en los últimos años autores como Ireland *et al.*, (2007), mencionan que la variabilidad individual de las donadoras a los procesos de SOV es alta, debido a la cantidad de folículos disponibles al inicio de los protocolos, teniendo un efecto directo sobre la calidad y cantidad de embriones producidos.

Si bien esta variabilidad individual no ha permitido tener resultados homogéneos entre las donadoras, se ha demostrado que es una característica con alta repetitividad dentro de un mismo animal; además, la heredabilidad a su descendencia es alta (Jaton *et al.*, 2016). Actualmente, la técnica utilizada para identificar y seleccionar donadoras, con esta característica (cantidad alta de folículos) es el recuento de folículos antrales (RFA) por ultrasonografía (Singh *et al.*, 2004). Sin embargo, es una técnica que requiere profesionales capacitados, equipo costoso e instalaciones adecuadas para facilitar la valoración cuidadosa de las imágenes (Perry & Cushman, 2016).

Una alternativa para seleccionar donadoras que viene tomando fuerza en los últimos años, es la utilización de la hormona Antimülleriana (AMH), glicoproteína producida por las células de la granulosa de los folículos antrales pequeños, que a decir de Mossa *et al.*, (2017); Center *et al.*, (2018) podría servir como marcador endócrino de la población folicular existente, ya que mantienen relación directa con el número de folículos antrales, esta correlación podría permitir realizar una predicción confiable de las respuestas superovulatorias de las futuras donadoras (Batista *et al.*, 2014; Guerreiro *et al.*, 2014). Lamentablemente, dichos estudios solo han sido realizados a profundidad en *Bos indicus* y las que existen en *Bos taurus*, llevadas a cabo en el trópico bajo, en condiciones de estabulación o en sistemas extensivos. Además, hay autores como Ayala *et al.*, (2019), quienes describen que la raza, el



manejo, la alimentación y las condiciones medioambientales podrían alterar la fisiología reproductiva en los bovinos.

Por lo antes expuesto y considerando que la mayoría de las ganaderías del sur del Ecuador, se encuentran sobre los 2500 msnm, y tienen a la Holstein mestiza como raza predilecta para la producción lechera, bajo un sistema de alimentación netamente pastoril (INEC, 2011), se hace necesario solventar la pregunta qué si la concentración de AMH mantiene relación con la respuesta a la SOV en esta raza y bajo dichas condiciones medioambientales y alimenticias.



## **2. OBJETIVOS.**

### **2.1. Objetivo general.**

Establecer si la AMH sirve como un marcador endocrino confiable para estimar la producción de embriones transferibles en donadoras de raza Holstein mestizas, bajo sistemas de pastoreo sobre los 2500 msnm.

### **2.2. Objetivos específicos.**

- Determinar la concentración sérica de AMH, para clasificar a las donadoras en grupos con altos y bajos niveles hormonales.
- Valorar la respuesta al proceso de SOV, así como la cantidad y calidad de embriones obtenidos en los grupos de alta y baja concentración de AHM.
- Establecer la relación entre la concentración sérica de AMH y la respuesta a la superovulación, la cantidad y calidad de los embriones producidos.

### **2.3. Hipótesis.**

La hormona Antimülleriana es un buen marcador endocrino confiable para seleccionar posibles buenas donadoras de raza Holstein mestizas, criadas sobre los 2.500 msnm. y alimentadas al pastoreo.



### **3. REVISIÓN DE LITERATURA.**

#### **3.1. Generalidades de la transferencia de embriones.**

La transferencia de embriones (TE) es una técnica reproductiva, que consiste en recoger el o los embriones de una hembra conocida como donante y posteriormente transferirlo al útero de una receptora. Es una técnica consolidada en el ámbito reproductivo, que ha sido implementada comercialmente en la ganadería desde principios de los años 70, cuando el ganado de origen europeo se hizo popular en América, Australia y Nueva Zelanda (Seidel & Moore, 1991). Sin embargo, su desarrollo y descubrimiento se produjo mucho antes; Walter Heape en 1890 realizó con éxito la primera transferencia de embriones en conejos y luego de esto, pasó mucho tiempo para que se produjera el primer nacimiento de un ternero por transferencia de embriones que fue por los años de 1950 (Betteridge, 2003).

Inicialmente la recolección de los embriones en las donadoras se realizaba mediante técnicas quirúrgicas asépticas, lo que generalmente ocasionaba infertilidad y subfertilidad en las donadoras recolectadas (Seidel & Moore, 1991). En 1976 Elsdén *et al.*, describieron la técnica de recolección no quirúrgica de embriones bovinos, teniendo una tasa de recuperación del 71%. A partir de esta y otras publicaciones, la técnica quirúrgica de recolección de embriones quedó en desuso siendo remplazada hasta la actualidad por procedimientos mejorados de recuperación no quirúrgica de embriones (Hasler, 2014). Posteriormente la producción *in vitro* de embriones; combinando punción ovárica (OPU), fecundación *in vitro* (IVF) y TE se desarrolló como una alternativa a la multiovulación y la TE. Gracias a estos avances, es posible congelar los embriones y almacenarlos para uso futuro, evitar situaciones de enfermedad, producir embriones de novillas reproductivamente inmaduras y evaluar los embriones antes de su transferencia (Moore & Hasler, 2017).

#### **3.2. Multiovulación y transferencia de embriones.**

La multiovulación y transferencia de embriones (MOET), fue denominada en 1983 por Nicholas y Smith para referirse a la transferencia de embriones y la tecnología relacionada en el contexto de la optimización del mejoramiento genético del ganado (Seidel & Moore, 1991). El objetivo principal de MOET es seleccionar en base a las pruebas de rendimiento y análisis de pedigrí a los animales élite, y así poder reducir el intervalo de generación, en comparación con otros métodos de mejoramiento genético como la inseminación artificial. Los programas de MOET actuales se caracterizan por la formación de un hato, mediante superovulación repetida de



donantes seleccionadas. Es más probable que estos programas reproductivos de mejoramiento genético tengan éxito, debido a la mayor intensidad de selección entre hembras y un intervalo de generación más corto. En el ganado de carne, las ganancias genéticas se pueden aumentar en un 30–65% al usar MOET, mientras que, en el ganado lechero, la tasa de ganancia genética es 10 a 25% (Lonergan & Boland, 2011).

Los esquemas de MOET han demostrado que las mejoras genéticas son posibles, sin embargo, el número de embriones producidos por donante es variable y, por lo tanto, también el número de descendientes ha sido muy variable (Arega, 2019). Por lo tanto, a pesar de que esta técnica ha permitido mejorar el número de animales genéticamente superiores en hatos de todo el mundo, no es menos cierto que el número de embriones obtenidos por donante no ha mejorado en los últimos 35 años (Hasler, 2014). Un factor fundamental puede ser la variabilidad individual en la reserva folicular que presentan los animales seleccionados para participar en los programas MOET, presentando diferentes respuestas a la superovulación y por ende en la colección de embriones (Jaton *et al.*, 2016).

Si observamos desde un punto de vista general, un bovino nace con aproximadamente unos 150000 folículos primordiales y de estos menos de 100 van a madurar y ovular a lo largo de su vida reproductiva (Starbuck, 2005). En consecuencia, el número de crías obtenidas por vaca puede incrementar significativamente si se aplica la TE. Puesto que, desde los inicios de la TE, esta técnica ha permitido mejorar eficientemente la ganancia genética en el ganado, ya que influye directamente sobre las cuatro variables básicas de mejoramiento genético, que son: cantidad de variación genética para las características a mejorar, la exactitud con que los progenitores de la siguiente generación pueden ser seleccionados, la intensidad de selección y el intervalo generacional (Arthur *et al.*, 1991). Además se considera a la TE como una importante herramienta de la investigación, siendo muy importante en los estudios de transmisión de enfermedades, existiendo evidencia que sugiere la baja probabilidad de que los embriones propaguen enfermedades bacterianas y virales, cuando son transferidos en las receptoras; siendo la zona pelúcida una efectiva barrera a la infección de células embrionarias (Tribulo & Bó, 2009).

### **3.2.1. Superovulación.**

La secuencia de eventos que conducen a MOET generalmente empieza con la superovulación de las donadoras, cuyo objetivo es producir la mayor cantidad de ovulaciones, mediante la sobre estimulación hormonal exógena de los folículos



antrales, presentes en la onda folicular emergente (Mapletoft *et al.*, 2002). Sin embargo, como se ha mencionado, existe una alta variabilidad en la respuesta superovulatoria por parte de las donadoras, lo que constituye uno de los factores limitantes a la técnica (Bó & Mapletoft, 2014; Tríbulo, 2015). Se han realizado varios estudios, los cuales determinan que el 64% de las donadoras que ingresan a los programas MOET, responden y producen embriones, sin embargo, solo el 30% de estas donadoras producen el 70% de embriones transferibles (Mapletoft *et al.*, 2002). Por lo tanto, existe un amplio margen de impredecibilidad en la respuesta superovulatoria de los animales seleccionados, crean problemas en la eficiencia de la técnica y en la rentabilidad de los programas MOET.

### **3.3. Factores que afectan la superovulación.**

Como ya se mencionó, existe un amplio margen de impredecibilidad en la respuesta superovulatoria de las donadoras, esto puede ser debido a varios factores que han sido reportados como influyentes en la respuesta a los tratamientos de superovulación. Estos factores pueden estar relacionados con el estatus fisiológico del animal (factores intrínsecos) como puede ser la edad, raza, estatus nutricional o el estado del ovario al momento de la implementación del tratamiento. Otros factores como la época del año, manejo, nutrición y pureza o dosis de la hormona utilizada pueden ser considerados como factores extrínsecos (Kafi & McGowan, 1997).

#### **3.3.1. Factores intrínsecos.**

##### **3.3.1.1. Edad.**

El efecto de la edad sobre la respuesta superovulatoria en el ganado lechero ha sido muy estudiada por varios investigadores, encontrando diferencias en sus resultados. Hasler en 1992, concluyó que la edad no es un factor determinante que influye en la respuesta a la SOV, al no encontrar significancia en la respuesta de vacas superestimuladas desde los 2 hasta los 14 años. Donaldson observó que no existe diferencia en la calidad de embriones producidos en donantes hasta los 9 años, pero a partir de esa edad existe una menor respuesta superovulatoria y por lo tanto menor cantidad y calidad de embriones transferibles (Tríbulo, 2015). Sin embargo, Becaluba (2007), en su revisión, menciona que a mayor edad de las donadoras existe una disminución en la respuesta superovulatoria; además, la edad está en estrecha relación con la dosis de la hormona administrada a las donadoras.



### **3.3.1.2. Raza.**

En la última década se han incrementado los estudios sobre las diferencias en la fisiología reproductiva entre el ganado *Bos taurus* y el ganado *Bos indicus*. Por lo que, se han estimado grandes diferencias, principalmente en el recuento de folículos antrales (RFA), siendo dos veces mayor en la raza Nelore en comparación con la raza Holstein (Sartori *et al.*, 2016). A pesar de que el principal componente es el factor genético en las razas, los distintos fines zootécnicos a las que son destinadas, probablemente generan cambios en su metabolismo general que al parecer afecta directamente al crecimiento folicular, calidad de ovocitos y el nivel hormonal en el ganado (Morotti *et al.*, 2017).

Está claro que el RFA está asociado tanto con la fertilidad como con la capacidad a la respuesta superovulatoria (Koyama *et al.*, 2018). El número de folículos presentes en los ovarios son muy variables entre individuos, pero un rasgo importante es la repetibilidad de esta característica del mismo (Ireland *et al.*, 2007), demostrando así que la variación individual es evidente entre razas y animales dentro de una misma raza.

### **3.3.1.3. Estado nutricional.**

Se ha comprobado que la condición corporal y los cambios dietéticos en los animales influyen directamente en la fertilidad, produciendo alteraciones en la función ovárica de los animales por lo que se podría relacionar con una disminución en la calidad de los embriones. En 2005 Adamiak *et al.*, demostraron que efectivamente la calidad de los ovocitos depende de la condición corporal del animal (C.C), teniendo una mejor calidad de blastocitos, en vacas que tenían un alto nivel energético en su alimentación y por lo tanto una C.C mayor a tres puntos. Así mismo se demostró que en protocolo de SOV, las donadoras que se encuentran entre una CC de 3,00 – 3,25 producen embriones de excelente calidad a diferencia de vacas que tienen una CC mala o incluso vacas que están por encima de una óptima CC tienen una pobre producción de embriones (Kadokawa *et al.*, 2008).

## **3.3.2. Factores extrínsecos.**

### **3.3.2.1. Tipo de hormona.**

Para realizar SOV se han utilizado gonadotropinas como la Gonadotropina coriónica equina (eCG), Hormona foliculoestimulante (FSH) y Gonadotropina coriónica humana (hCG) (Garzón *et al.*, 2007). Los protocolos tradicionales de superovulación se realizan con la aplicación intramuscular de una dosis única de eCG o la



administración de extractos de pituitaria con FSH cada 12 horas por 4 días (Tribulo, 2015). Actualmente las donadoras son superestimuladas con FSH ya que se ha demostrado que existe una mejor respuesta superovulatoria (Mapletoft & Bó, 2012). Además, la mayoría de técnicos prefieren la aplicación de FSH ya que la vida media plasmática de eCG es alrededor de 40 días y persiste en la circulación por 10 días lo que ocasiona una estimulación ovárica continua, folículos no ovulados, perfiles endócrinos anormales y calidad reducida de los embriones (G. Bó & Mapletoft, 2014).

### **3.3.2.2. Pureza de la hormona.**

El uso de FSH comenzó con la administración de extractos crudos de pituitaria que contenían FSH más hormona luteinizante (LH), lo que se traducía en una respuesta y calidad embrionaria reducida debido a que los altos niveles de LH durante la superestimulación causan activación prematura de los ovocitos. Se ha comprobado que la administración de extractos purificados de FSH con baja contaminación de LH ha mejorado la respuesta superovulatoria en él ganado (G. Bó & Mapletoft, 2014).

### **3.3.2.3. Dosis de la hormona utilizada.**

En el caso del uso de la FSH en los protocolos de SOV se debe tomar en cuenta la dosis total de la hormona que va a ser administrada, ya que existe gran variabilidad de la misma; debido principalmente al tipo de FSH y la raza que ingresa a los programas de MOET e incluso a la diferencia existente entre individuos (Jiménez, 2009). El ganado *Bos taurus* al ser menos sensible a las hormonas exógenas la dosis total y el número de aplicaciones de FSH no se ha podido llegar a disminuir como se ha realizado en *Bos indicus*, lo que se manifiesta con mayor estrés y una menor calidad de los embriones obtenidos por parte de las donadoras (Becaluba, 2007; Baruselli *et al.*, 2011). Se puede manipular las dosis de FSH para mejorar la respuesta superovulatoria en los animales; sin embargo, existe un umbral en el cual al sobrepasarlo existe una menor respuesta superovulatoria y por lo tanto disminuye la calidad de los embriones recolectados (Jiménez, 2009).

## **3.4. Protocolos de superovulación.**

El objetivo de la superovulación es la sobreestimulación del desarrollo folicular mediante la aplicación de hormonas exógenas en las vacas donadoras, por lo que se han descrito una serie de procedimientos que se pueden utilizar al momento de realizar SOV (**Fig. 1**).



Los protocolos tradicionales de SOV se utilizan en conjunto con la fisiología del ciclo estral, comenzando el procedimiento al inicio de una onda folicular (Jiménez, 2009) especialmente en la onda luteal media entre los días 8 y 12 del ciclo estral, ya que en vacas de dos o tres ondas foliculares el comienzo de la segunda onda se da entre estos días, teniendo una mayor respuesta a la superovulación cuando el inicio del tratamiento con las gonadotropinas se da justo en el comienzo de la onda folicular (Mapletoft & Bó, 2012). Por lo tanto, el tratamiento tradicional puede generar dos inconvenientes: a) requiere de personal capacitado dedicado a la detección de celos y una respuesta efectiva del 100% y b) tener a todas las donadoras iniciando la nueva onda folicular justo el día que se decide realizar la superovulación (Bó *et al.*, 2011).

Una alternativa para solucionar estos problemas es el control de la nueva onda folicular emergente para comenzar los protocolos de SOV siendo demostrado que la sincronización de la onda folicular mejora la cantidad de embriones transferibles con respecto a los protocolos tradicionales de detección de celo (Soria *et al.*, 2017). Generalmente, se han usado tres métodos para la sincronización de la emergencia de la nueva onda folicular: 1) uso de progesterona y estradiol; 2) ablación folicular; 3) uso de GnRH o LH porcina (Tribulo, 2015).

### **3.4.1. Sincronización de la onda folicular.**

#### **3.4.1.1. Progesterona y estradiol.**

Ha sido ampliamente investigada la aplicación de progesterona (P4) y estradiol para estimular la emergencia de la nueva onda folicular sin tomar en cuenta el estado del ciclo estral en los bovinos (Soria *et al.*, 2017), por lo que, es uno de los protocolos más utilizados en la actualidad. En Sudamérica se puede conseguir varios tipos de esteroides de estradiol como el Benzoato de estradiol (BE); Valerato de estradiol (EV) y Cipionato de estradiol (ECP), sin embargo, el más utilizado es el BE por que posee una vida media más corta (Garzón *et al.*, 2007). La aplicación de 2–2.5 mg BE más 50 mg de P4 por vía intramuscular al momento de la aplicación de un dispositivo de Progesterona, suprime la liberación de FSH lo que ocasiona una atresia folicular (Mapletoft *et al.*, 2002; Mapletoft & Bó, 2012). Una vez metabolizado el estradiol, existe la liberación de FSH lo que ocasiona el inicio de una nueva onda folicular en 3 o 4 días después de la aplicación de BE (Baruselli *et al.*, 2011). Por consiguiente, se realiza la aplicación de gonadotropinas (FSH) al 4to día después del tratamiento.



### 3.4.1.2. Ablación folicular.

En Europa y América del Norte, se ha restringido el uso de esteroides de estradiol, por lo que la ablación folicular puede ser una alternativa para sincronizar la nueva onda folicular. Es una técnica mecánica, la cual consiste en eliminar el efecto de supresión que tiene el folículo dominante, mediante la detección de los folículos por ultrasonografía transvaginal y posteriormente su aspiración, lo que ocasiona el comienzo de una nueva onda folicular en 1,5 días (Tríbulo, 2015). Inicialmente se realizaba la ablación a todos los folículos  $\geq 5$  mm, pero se demostró que solo era necesario realizar la ablación a los dos folículos más grandes (Baracaldo *et al.*, 2000). A pesar de que la ablación folicular ha sido demostrada que tiene una alta eficacia, se requiere un equipo de ultrasonido y personal capacitado en la técnica, lo que dificulta su uso en el campo (G. Bó & Mapletoft, 2014).

### 3.4.1.3. GnRH o LH porcina.

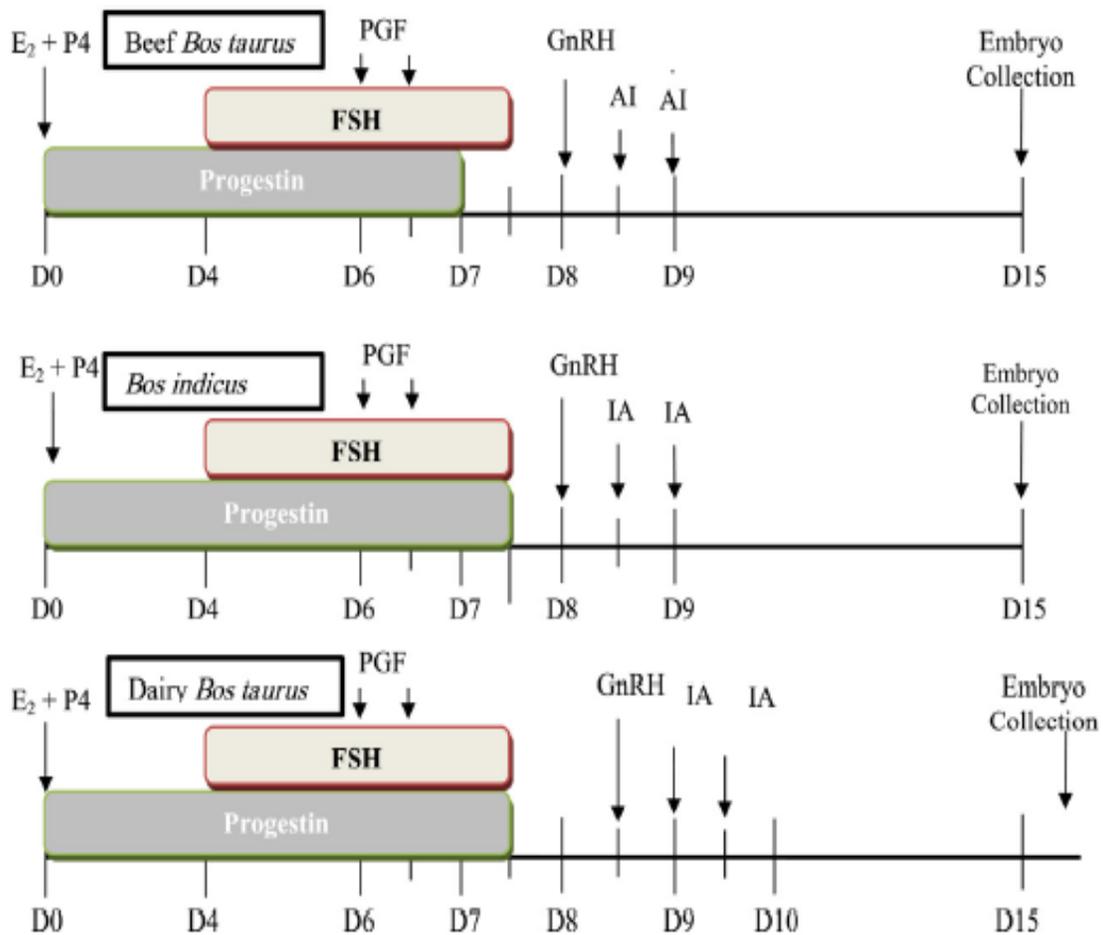
Se ha demostrado que los tratamientos con GnRH o pLH que inducen ovulación, se produce una nueva onda folicular entre 1,5–2 días. Sin embargo, la emergencia de una nueva onda folicular se da siempre y cuando exista ovulación. Esto genera complicaciones ya que se comprobó que la administración de GnRH en cualquier momento del ciclo estral induce la ovulación solamente en el 60% en ganado de carne y entre el 44% al 54% en ganado de leche (G. Bó & Mapletoft, 2014).

### 3.4.1.4. Protocolos actuales de superovulación.

La vida media de la FSH en la vaca se ha estimado en 5 horas, por lo que debe administrarse dos veces al día para inducir con éxito la superovulación. El régimen habitual ha sido la aplicación de FSH cada 12 horas durante 4 o 5 días, con una dosis total de 28 a 50 mg de un extracto pituitario crudo o 400 mg NIH-FSH-P1 de un extracto pituitario parcialmente purificado (Folltropin-V; Bioniche Animal Health Inc., Belleville, Ontario, Canadá). 48 o 72 horas después del inicio del tratamiento, se administra PGF2 $\alpha$  para inducir luteólisis. El estro ocurre en 36 a 48 horas, con ovulaciones que comienzan 24 a 36 horas más tarde (G. Bó & Mapletoft, 2014). Se ha utilizado implantes de liberación de P4 en los protocolos para asegurar que las donadoras no entren en celo tempranamente, en especial aquellas que no se ha identificado previamente la presencia de cuerpo lúteo antes del inicio del tratamiento con FSH.

El desarrollo de un protocolo de SOV que permita inseminar a tiempo fijo (FTAI) en ganado *Bos taurus* y *Bos indicus* tratados con dispositivos de liberación de P4 y EB el primer día del protocolo (Día 0) ha sido ampliamente investigado. Los protocolos

se nombran de acuerdo con el tiempo transcurrido desde el primer tratamiento con PGF2 $\alpha$  hasta el momento del retiro de los dispositivos de P4, que ocurre antes de la inducción de la ovulación para evitar el efecto perjudicial de la alta concentración de P4 en la calidad del embrión durante el período de ovulación. Por lo tanto, cuando la PGF2 $\alpha$  se administra en el Día 6 AM y el dispositivo de P4 se retira el Día 7 AM, el tratamiento se llama "P-24" (es decir, un intervalo de 24 h entre la aplicación de PGF2 $\alpha$  y la eliminación del dispositivo P4), mientras que cuando El dispositivo P4 se retira el día 7 PM, el tratamiento se llama "P-36". No se han detectado diferencias significativas en el número y la calidad de los embriones transferibles entre los tratamientos P-24 y P-36. Por lo tanto, ambos tratamientos se pueden usar para superovular a *Bos taurus* y *Bos indicus*, la inseminación se realiza 12–24 h después de la última aplicación de FSH (Baruselli *et al.*, 2011) (**Fig. 1**).



**Figura 1:** Protocolos de SOV en distintas razas de ganado.

**Fuente:** (G. Bó & Mapletoft, 2014)



### **3.5. Colección de embriones.**

Como ya se mencionó anteriormente, la colección de embriones se efectuaba mediante técnicas quirúrgicas. Se realizaba una laparotomía en la línea del flanco para la recuperación de embriones, estos procedimientos resultaban ser muy invasivos; costosos, demorados y difíciles para los técnicos que realizaban las cirugías. Además, era muy difícil realizar la recolección de embriones en las mismas donadoras ya que la recuperación post quirúrgica era larga y generalmente terminaban con problemas de infertilidad debido a la formación de adherencias en los ovarios (Moore & Hasler, 2017). Elsdén *et al.*, (1975) describieron la técnica de recolección no quirúrgica de embriones bovinos teniendo una tasa de recuperación del 71%. A partir de esta y otras publicaciones, la técnica quirúrgica de recolección de embriones quedó en desuso siendo remplazada hasta la actualidad por procedimientos mejorados de recuperación no quirúrgica de embriones (Hasler, 2014).

Es necesario tener en cuenta que para mantener la viabilidad de los embriones fuera del útero se debe evitar los cambios bruscos de temperatura, osmolaridad (270 – 310 miliosmoles) o Ph (rango adecuado 7,2–7,6). Se han desarrollado medios de lavado que buscan igualar las condiciones del ambiente uterino para un manejo adecuado de los embriones, por ejemplo la solución de Hardmann modificada y la solución amortiguadora fosfatada (PBS) son las más utilizadas para el lavado de embriones (Boeta & Balcázar, 2018).

#### **3.5.1. Técnica no quirúrgica de recolección de embriones.**

Consiste en realizar un lavado interno de los cuernos uterinos siete días después de la inseminación artificial de la donadora, por lo tanto, los embriones son recolectados con la ayuda de un catéter (Tríbulo & Bó, 2009). Esta técnica fue desarrollada a partir del paso de una sonda por el cérvix uterino, posibilitando la recolección de embriones, simplificando el procedimiento y disminuyendo el trauma uterino, permitiendo que por más de 35 años se recolecten embriones a partir de métodos no quirúrgicos (Palma, 2001).

Se han creado diferentes tipos de catéteres, los cuales pueden ser: rígidos, semirígidos y flexibles. Además se pueden emplear tres tipos de recolección: circuito cerrado con flujo continuo, circuito cerrado con flujo discontinuo y circuito abierto con flujo discontinuo (Seidel & Moore, 1991).



### **3.5.1.1. Circuito cerrado con flujo continuo.**

Con este método se pueden utilizar catéteres rígidos o flexibles de tres vías. En este caso la primera vía se destina a la inyección del medio de lavaje por gravedad, en la segunda vía se inyecta aire para llenar el balón de la sonda y la tercera vía se utiliza para la recolecta de la solución de lavaje proveniente del útero (Baracaldo *et al.*, 2000). Este sistema permite una recolección más rápida, ya que la entrada y salida del medio se realiza de forma automática en el tercio distal del cuerno uterino, teniendo un lavado más eficiente del cuerno donde se sitúan la mayoría de los embriones en los primeros estadios de desarrollo (Arthur *et al.*, 1991). Sin embargo, no es muy aplicable en el campo debido al costo del sistema y además los catéteres rígidos pueden provocar lesiones en la mucosa.

### **3.5.1.2. Circuito cerrado con flujo discontinuo.**

En este método se emplea un catéter de dos vías que consiste en: una válvula automática o manual, una unión en forma de “T” o “Y” y las tubuladuras. La válvula se coloca a la salida del frasco que contiene el medio por lo que permite su salida hacia el cuerno uterino, la unión permite que el flujo que proviene del cuerno uterino se desvíe al frasco recolector y las tubuladuras son las vías que salen de los frascos y terminan por acoplarse a las uniones. Este sistema tiene menos probabilidades de obstruirse que el sistema anterior ya que el flujo de entrada y salida se realiza por la misma vía (Baracaldo *et al.*, 2000).

### **3.5.1.3. Circuito abierto con flujo discontinuo.**

Esta técnica se realiza mediante la inyección y recolección del medio con una jeringa conjuntamente con un catéter flexible de dos vías, en la que el volumen del medio se inyecta y recolecta por la misma vía por medio de la jeringa la cual es descargada en un filtro recolector. Los operadores al desarrollar esta técnica realizan diferentes maniobras para asegurarse que el volumen del medio que ingresó regrese de la misma manera, por lo que utilizan masajes uterinos para estimular el regreso del fluido. Cabe mencionar que esta técnica es rápida y sencilla sobre todo si se realiza en un animal manso, debido a que la técnica se realiza por varias veces (Palma, 2001).

## **3.5.2. Preparación de la donadora previo a la colección de embriones.**

Previo a realizar la maniobra de recolección de embriones, se debe inmovilizar a la donadora, posteriormente se debe realizar un vaciado del recto del animal para luego lavar y desinfectar la región perineal y vulvar. Es recomendable que el técnico



al momento de realizar el vaciado del recto identifique la disposición del útero, así como también el número de cuerpos lúteos que se encuentran en los ovarios, para tener una mayor facilidad al momento de realizar la maniobra de recolección (Lonergan & Boland, 2011). Las donadoras normalmente reciben anestesia epidural entre la primera y segunda vértebra coccígea con una dosis de 40 a 80 mg de clorhidrato de lidocaína (2 – 4 ml de lidocaína al 2%), para relajar el recto y así poder realizar las técnicas de lavaje uterino (Medrano *et al.*, 2014). En animales indóciles es recomendable tranquilizar con 0,10 – 0,30 mg/kg de clorhidrato de xilacina (Palma, 2001).

### **3.5.3. Lavado de embriones.**

El momento de la recuperación de embriones se realiza en el séptimo día luego de la manifestación de celo. Se realiza por medio de manipulación rectal, mediante una amplia variedad de técnicas de lavado mencionadas anteriormente con tasas de éxito aparentemente aceptables. Usando un estilete de acero inoxidable para proporcionar rigidez, algunos técnicos colocan el catéter a través del cuello uterino e inflan el manguito en el orificio cervical interno. Otros suben el catéter hasta la mitad de un cuerno o en algunos casos incluso más, y enjuagan cada cuerno individualmente (Hasler, 2014). Generalmente implica el uso de un volumen relativamente grande (500–2000 ml) de medio de lavado que se introduce dentro y fuera del útero, algunos profesionales introducen el medio de lavado en el útero con la ayuda del flujo por gravedad, mientras que otros usan una jeringa grande y agregan secuencialmente volúmenes más pequeños de medio. Generalmente se utiliza DPBS (Dubelco phosphate-buffered saline) suplementado con suero fetal bovino y fosfato como buffer, temperado a 37° como medio de lavaje (Moore & Hasler, 2017). Normalmente, más del 90% del fluido administrado se recupera, pero solo alrededor del 60-70% de los ovocitos ovulados se recuperan como embriones (Lonergan & Boland, 2011). El medio obtenido de los cuernos es filtrado a través de un filtro de recolección el cual por lo general presenta mallas de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro, permitiendo pasar el líquido mas no los embriones. Posteriormente el filtro se lleva al laboratorio, hay que tomar en cuenta que los embriones bovinos tienen alta adaptabilidad al medio uterino materno, por lo que se deben mantener estrictamente bajo condiciones óptimas de PH ( $7,4 \pm 0,5$ ) y osmolaridad (285 – 300 miliosmoles/litro) (Tríbulo & Bó, 2009).

### **3.6. Búsqueda y evaluación de embriones.**

Para recuperar los embriones del filtro, se gira el contenedor del filtro y se vierte el contenido en un plato de búsqueda y luego el filtro se enjuaga rápidamente en

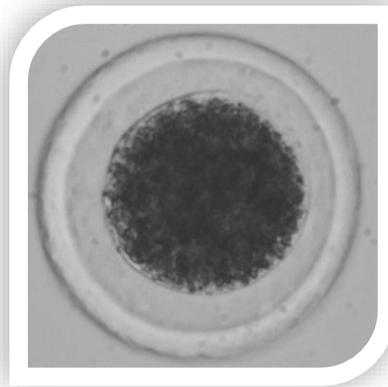
círculos concéntricos mientras se lo mantiene parcialmente invertido. Es importante evitar la formación de espuma ya que los embriones se pierden fácilmente entre las burbujas, que persisten durante horas. Los lados del filtro y la rejilla deben enjuagarse varias veces hasta que desaparezcan todos los vestigios de moco y residuos celulares. Esto requiere un considerable enjuague a alta presión (Seidel & Moore, 1991).

Para determinar la calidad de los embriones recuperados, normalmente se realiza con un estereomicroscopio con una magnificación de 50 a 100X. El diámetro de un embrión está entre 150 – 190  $\mu\text{m}$ , incluyendo la zona pelúcida que está entre 12 – 15  $\mu\text{m}$  (G. A. Bó & Mapletoft, 2013). La IETS ha establecido criterios claros de evaluación, en los que principalmente se caracterizan en el tamaño de la célula, forma del embrión, grado de extrusión del blastómero y el color. Por lo que se pueden clasificar a los embriones en excelentes, buenos, regulares y degenerados (Lonergan & Boland, 2011). Sin embargo, es muy importante conocer las etapas de desarrollo del embrión, para poder clasificarlos al momento de realizar la recuperación de los embriones. Los criterios de clasificación por parte de (IETS., 2010) son descritos a continuación.

### 3.6.1. Etapa de desarrollo del embrión:

Para identificar el momento de desarrollo que tiene el embrión se ha estandarizado en reconocerlos de acuerdo con códigos numéricos: que se detalla a continuación:

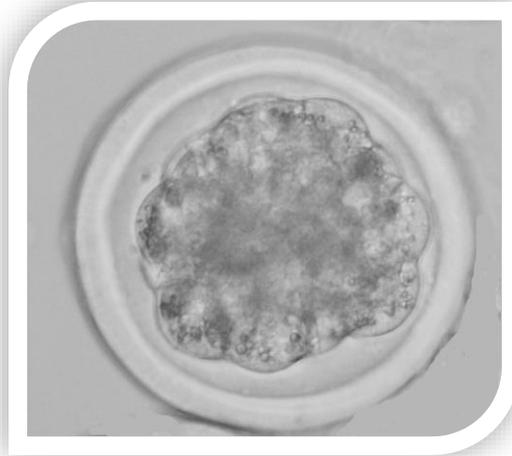
Ovocito sin fecundar (código 1) (**Fig. 2**).



**Figura 2:** Ovocito sin fecundar (UFO).

**Fuente:** (Phillips & Jahnke, 2016).

Mórula (Código 3): Es una masa que tiene alrededor de 16 células, siendo difícil de distinguir los blastómeros entre sí, ocupando la mayor parte del espacio perivitelino (**Fig. 3**).



**Figura 3:** Mórula temprana.

**Fuente:** (Phillips & Jahnke, 2016).

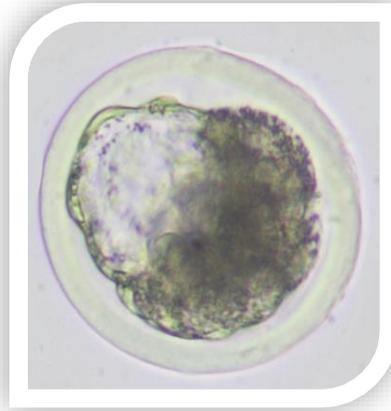
Mórula compacta (Código 4): Los blastómeros se han unido para formar una masa compacta la cual ocupa el 60 – 70 % del espacio perivitelino (**Fig. 4**).



**Figura 4:** Mórula

**Fuente:** (Phillips & Jahnke, 2016).

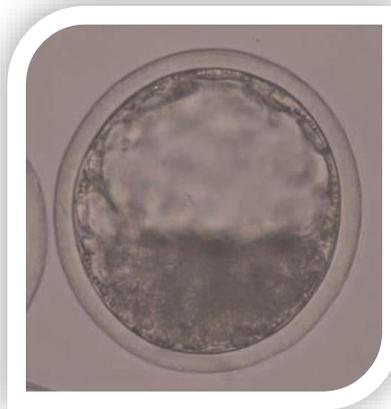
Blastocisto temprano (Código 5): Ha formado el blastocele y da una apariencia general de un anillo. El embrión ocupa del 70 al 80% del espacio perivitelino. Es difícil diferenciar la masa de la célula interna de las células trofoblásticas en este momento (**Fig. 5**).



**Figura 5:** Blastocisto temprano.

**Fuente:** (Phillips & Jahnke, 2016).

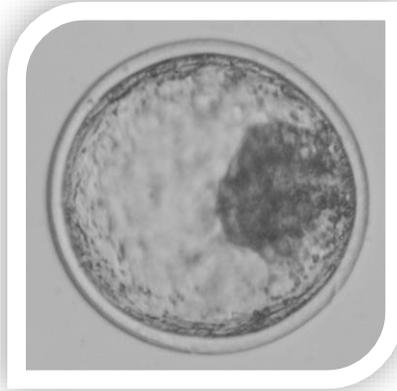
Blastocisto (Código 6): Es evidente la diferenciación de la capa trofoblástica externa y de la masa celular interna que es más compacta y oscura. El blastocele es muy prominente, y el embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino. La diferenciación visual entre el trofoblasto y la masa celular interna es posible en esta etapa de desarrollo (**Fig. 6**).



**Figura 6:** Blastocisto.

**Fuente:** (Phillips & Jahnke, 2016).

Blastocisto expandido (Código 7): El diámetro total del embrión aumenta con un adelgazamiento concurrente de la zona pelúcida a aproximadamente un tercio de su espesor original (**Fig. 7**).



**Figura 7:** Blastocisto expandido.

**Fuente:** (Phillips & Jahnke, 2016).

Blastocisto eclosionado (Código 8): En esta etapa de desarrollo pueden estar experimentando el proceso de eclosión o pueden haber eliminado completamente la zona pelúcida. Los blastocistos eclosionados pueden ser esféricos con un blastocele bien definido o puede estar colapsado (**Fig. 8**).

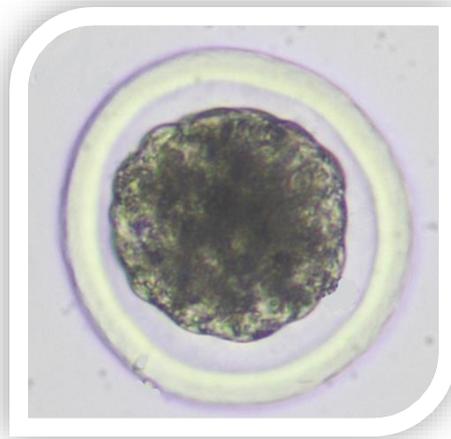


**Figura 8:** Blastocisto eclosionado.

**Fuente:** (Phillips & Jahnke, 2016).

### 3.6.2. Calidad del embrión.

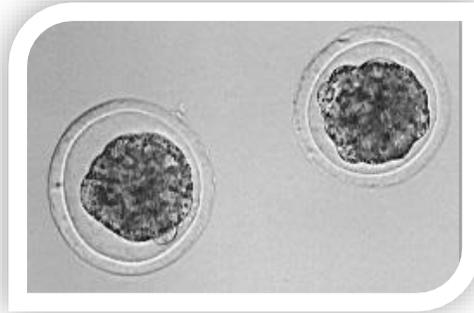
Excelente o Bueno (Código 1): Los embriones tienen una masa simétrica y esférica con blastómeros individuales que son uniformes en tamaño, color y densidad. Al menos el 85% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta y viable. La zona pelúcida debe ser lisa y no debe tener superficies cóncavas o planas que puedan hacer que el embrión se adhiera a una placa de Petri o una pajilla. Los embriones del Código 1 sobreviven bien al procedimiento de congelación / descongelación y algunos practicantes los llaman "embriones congelables". Los embriones de grado 1 son también aquellos recomendados para el comercio internacional (**Fig. 9**).



**Figura 9:** Mórula de excelente calidad.

**Fuente:** (Phillips & Jahnke, 2016).

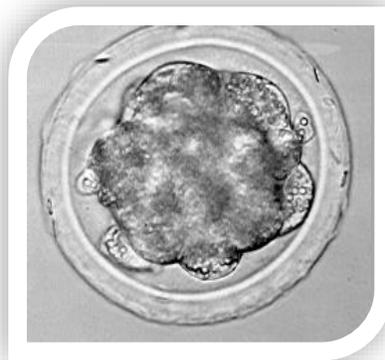
Regular (Código 2): Tiene irregularidades moderadas en la forma general de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 50% de la masa embrionaria debe estar intacta. La supervivencia de estos embriones al procedimiento de congelación / descongelación es menor que con los embriones de Grado 1, pero las tasas de gestación son adecuadas si los embriones se transfieren frescos a receptores. Por lo tanto, estos embriones a menudo se llaman "transferibles" pero no "congelables" (**Fig. 10**).



**Figura 10:** Dos mórulas de calidad buena.

**Fuente:** (G. A. Bó & Mapletoft, 2013).

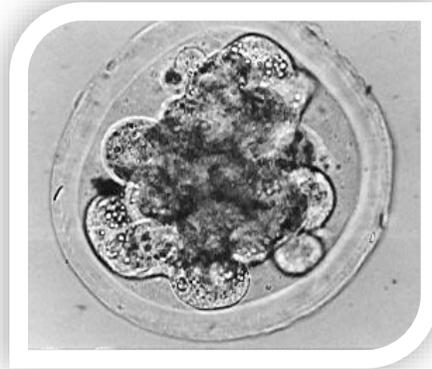
Malo (Código 3): Estos embriones tienen irregularidades importantes en la forma de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 25% de la masa embrionaria debe estar intacta. Estos embriones no sobreviven al procedimiento de congelación / descongelación y las tasas de preñez son más bajas que las obtenidas con embriones de buena calidad si se transfieren a receptoras adecuadas (**Fig. 11**).



**Figura 11:** Blastocisto de calidad regular.

**Fuente:** (Phillips & Jahnke, 2016).

Degenerado (Código 4): Estos podrían ser embriones con muchos defectos, desarrollo retardado, ruptura seria de la zona pelúcida, forma muy asimétrica, granulación o vacuolización de los blastómeros. Son inviábiles y deben ser descartados (**Fig. 12**).



**Figura 12:** Embrión degenerado.

**Fuente:** (Phillips & Jahnke, 2016).

### 3.7. Donadoras.

#### 3.7.1. Selección de la donadora.

La selección de las donadoras por lo general se realiza en función del mérito genético y la probabilidad de producir grandes cantidades de embriones. Las vacas donadoras actualmente son seleccionadas por el mercado, la clasificación genética o por la decisión de los propietarios de tener mayor número de crías de determinado animal (Lamb *et al.*, 2016).

La donadora debe tener un tracto reproductivo normal a la palpación y ecografía, con antecedentes de ciclicidad, preñez y postparto normales; por lo menos debe existir un postparto de 60 días previo a comenzar el programa. Palma (2008) sugiere que se seleccione las posibles donadoras en base a los siguientes criterios:

- Tener una condición corporal ideal, entre 3,0 – 3,5.
- El ciclo estral debe presentarse de manera regular y haber tenido un comienzo a edad temprana.
- Historial de no más de dos servicios por concepción.



- Terneros anteriores, con intervalos de 365 días aproximadamente.
- No haber presentado dificultades al parto o irregularidades reproductivas.
- No presentar defectos genéticos en conformación o que sean detectables.
- En caso de haber participado en programas anteriormente, este no debe ser inferior a cincuenta días de diferencia.
- No debe presentar ternero al pie.
- Edad entre quince meses y diez años.

### **3.7.2. Manejo de las donadoras.**

Anteriormente ya se mencionó sobre la influencia de muchos factores en la respuesta a la superovulación y al número de embriones de buena calidad por parte de las donadoras, siendo el manejo y la nutrición probablemente los factores más importantes que influye en la respuesta de las vacas donadoras (Adamiak *et al.*, 2005). Aunque otros autores observaron el manejo de las donadoras desde un punto de vista problemático, clasificando 3 categorías del problema: el propietario, el profesional o el animal en sí. La persona que realiza el protocolo puede ser el responsable del éxito del programa ya que factores como la experiencia, elección y aplicación de los tratamientos hormonales, equipo utilizado y personal influyen directamente en la respuesta (Phillips & Jahnke, 2016). La producción de embriones está relacionada también directamente con el animal, como, por ejemplo: raza, su ciclo estral, su estatus nutricional, entre otros, afectan directamente la respuesta. Es importante asegurar que las donadoras se mantengan en un plano nutricional positivo, alimentándolas con una dieta que cumpla con los requerimientos de mantenimiento (Lamb *et al.*, 2016).

### **3.8. Recuento de folículos antrales.**

El recuento de folículos antrales (RFA) se define como el número máximo promedio de folículos  $\geq 3$  mm de diámetro que crecen durante las ondas foliculares consecutivas de los ciclos estrales (Burns *et al.*, 2005), siendo un parámetro que puede indicar la reserva ovárica presente en el ganado. El RFA tiene una alta variabilidad entre vacas *Bos taurus* y *Bos indicus*, sin embargo, el número de folículos antrales observados en el mismo animal es ampliamente repetible (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2007; Phillips & Jahnke, 2016).



La ultrasonografía es un método poco invasivo y muy eficaz para cuantificar el número de folículos antrales que pueden ser observados a partir de los 2-3 mm de diámetro, siendo vistos como imágenes no ecogénicas, de una manera redondeada o difusa (Gutierrez & Báez, 2014). Por lo tanto, por medio de la ultrasonografía es posible seleccionar a vacas *Bos taurus* de acuerdo con el RFA ya que es repetible en los individuos independientemente de edad, estatus reproductivo, lactancia o tiempo de gestación. Basado en estas características las hembras pueden ser clasificadas en RFA alto, medio o bajo de acuerdo a la cantidad de folículos antrales cuantificados mediante ultrasonografía (Burns *et al.*, 2005; Morotti *et al.*, 2017).

Se ha relacionado que el RFA en ganado *Bos taurus* influye directamente en su rendimiento reproductivo, como por ejemplo: fertilidad, tasa de preñez y número de servicios por concepción (Morotti *et al.*, 2015). Mossa *et al.*, (2012) en su estudio vieron que las vacas con alto RFA tuvieron 3,34 veces más probabilidades de gestación en comparación con las vacas con bajo RFA. El intervalo desde el parto hasta la concepción fue más corto en el nivel alto ( $109,5 \pm 5,1$  d) versus el nivel bajo ( $117,1 \pm 4$  d). Concluyendo que las vacas lactantes con  $\leq 15$  folículos ováricos tienen un rendimiento reproductivo más bajo en comparación con las vacas con mayor número de folículos. Los mecanismos fisiológicos relacionados con el número de folículos y los parámetros de fertilidad no se comprenden actualmente.

Existen trabajos cuyos resultados son controversiales ya que se ha encontrado que hay una relación entre el bajo nivel de RFA con una mejor fertilidad en vacas lecheras. Esto puede ser explicado porque se han encontrado folículos más grandes en vacas que tienen un RFA bajo en comparación con aquellas vacas que tenían un RFA alto. Por lo tanto, se puede esperar que cada folículo tenga mayor cantidad de FSH al momento de aparecer la nueva onda folicular (Morotti *et al.*, 2017). Después de comparar el diámetro del folículo ovulatorio, muchos artículos han descrito mejores tasas de preñez en vacas con un diámetro de folículo preovulatorio de moderado a grande en comparación con hembras con diámetro de folículo pequeño en la ovulación.

### **3.8.1. Concentración de progesterona y recuento de folículos antrales.**

La producción de progesterona por parte del cuerpo lúteo es muy importante para mantener el adecuado ambiente uterino, para que se lleve a cabo un correcto desarrollo del embrión y se mantenga la gestación normalmente. Consecuentemente, la baja concentración de progesterona se ha relacionado con problemas reproductivos como mortalidad embrionaria y menor desarrollo del endometrio (Morotti *et al.*, 2017).



Se ha relacionado el número de folículos en el ovario con la concentración de progesterona en ganado *Bos taurus*, por lo que vacas que tenían un menor RFA (<10 folículos) mostraron bajas concentraciones de progesterona ( $6,5 \pm 0,3$  ng/ml) durante su ciclo estral, en comparación con las hembras con RFA alto (>15 folículos) y con mayores niveles de P4 ( $7,6 \pm 0,3$  ng/ml) (Sanderson *et al.*, 2015).

Las menores concentraciones circulantes de progesterona en las vacas con bajo RFA se atribuyeron principalmente a la disminución de la función del cuerpo lúteo, los posibles cambios en la capacidad de respuesta de las células lúteas a la LH, una posible reducción de la proteína en el cuerpo lúteo y la capacidad de respuesta disminuida de las células de la granulosa y las células lúteas para luteinizar el folículo preovulatorio (Morotti *et al.*, 2015).

### **3.8.2. Recuento de folículos antrales y su eficiencia en la producción de embriones.**

Varios estudios con razas europeas y algunos estudios con animales *Bos indicus* han demostrado que un mayor número de folículos se asocia con beneficios cuantitativos para el éxito de producción de embriones *in vitro* (PIV) y SOV (Silva-Santos *et al.*, 2014). El número promedio de embriones por colección fue mayor para las hembras que tenían un alto RFA en comparación con los animales con bajo RFA ( $6,9 \pm 5,3$  vs.  $1,9 \pm 2,1$ ;  $P < 0,05$ ). Por lo tanto, este estudio refuerza el concepto evidente de que hay beneficios cuantitativos de la producción de embriones según el número de folículos antrales. Demostrado por Ireland *et al.*, (2007) en donantes *Bos taurus*, con hembras con bajo RFA presentaron un número promedio más bajo de embriones producidos *in vitro* en comparación con animales con RFA alto (1,3 vs. 4,9 embriones). En la producción *in vivo* de embriones, las donadoras con bajo RFA (<15 folículos) produjeron menos estructuras en comparación con las hembras con alto RFA (>25 folículos), con un promedio de 3,8 frente a 5,4 embriones, respectivamente.

Sin embargo, en el ganado *Bos indicus* se encontraron resultados contradictorios en estudios realizados por Morotti *et al.*, (2015) los cuales no encontraron diferencias significativas en la producción de clivaje y blastocistos en vacas Nelore con RFA alto medio y bajo.

A pesar de las variaciones individuales, existe un consenso de que las ventajas cuantitativas de las donadoras con alto RFA deben ser explotadas. Por lo tanto, la variación en el número de folículos por donante es actualmente un aspecto muy importante para los programas comerciales de producción de embriones. Se usa comúnmente como un método de selección para elegir donadoras a través



ultrasonografía. Las donantes seleccionadas son generalmente aquellas con alto RFA o un alto número de ovocitos, que son variables directamente correlacionadas (Morotti *et al.*, 2015).

### 3.8.3. Recuento de folículos antrales y hormona Antimülleriana.

Existe una gran variabilidad en la población folicular del ganado bovino, no obstante ha demostrado ser repetible a lo largo de la vida reproductiva en los individuos (Ireland *et al.*, 2007). Un comportamiento similar presenta la AMH, que resulta ser constante durante todo el ciclo estral dentro de los mismos animales, con lo cual hace que esta hormona pueda considerarse como un buen marcador endócrino del RFA (Mossa *et al.*, 2017).

La relación establecida entre la AMH y el RFA en *Bos indicus*, *Bos taurus* y *Bubalus bubalis*, resultó ser alta entre cada una de las especies ( $r=0,785$ ;  $r=0,66$ ;  $r=0,62$ ;  $P<0,001$  respectivamente). Así mismo, en vacas *Bos taurus* una alta correlación ( $r=0,88$ ,  $P<0,001$ ) fue observada entre la AMH y el RFA. Los animales clasificados con un número alto de folículos antrales ( $39,61 \pm 2,3$ ), resultaron tener un mayor nivel de AMH (0,40 ng/ml) comparado al grupo de animales con bajo número de folículos antrales ( $11,95 \pm 1,2$ ) (Ireland *et al.*, 2008).

Esta relación hace que la AMH sea considerada un marcador endocrino confiable del RFA y abre la posibilidad de usar cualquiera de los dos métodos para seleccionar donadoras, teniendo en cuenta la accesibilidad a cada uno de estos.

### 3.9. Hormona Antimülleriana.

La hormona Antimülleriana es una glicoproteína perteneciente a la familia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) la cual es sintetizada por las células de la granulosa de los folículos antrales en crecimiento (2–5 mm) (Center *et al.*, 2018). Lleva el nombre debido a su papel en la diferenciación sexual masculina, que se identificó originalmente en los fetos machos de conejo como un factor testicular distinto de la testosterona producido por las células de Sertoli, que provoca la regresión de los conductos de Müller en los machos (Mossa *et al.*, 2017). Se descubrió que la síntesis de AMH en roedores se daba en los folículos primarios inmediatamente después de su formación, en ratas y ratones neonatos. La expresión del ARNm de AMH, posteriormente se encontró en las células de la granulosa de todos los folículos secundarios en etapa preantral; folículos antrales pequeños durante la primera ola de desarrollo prepuberal; y durante el ciclo estral (Baldrighi *et al.*, 2014).



La concentración en sangre de esta hormona se ha asociado positivamente con el recuento de folículos antrales en diferentes especies. Por ejemplo, en ratones se ha evidenciado una fuerte correlación ( $r=0,86$ ;  $P<0,0001$ ) y también, se demostró que los niveles de AMH disminuyen progresivamente con la edad de los individuos (4-8 meses de edad =  $28,34 \pm 7,12$  ng/ml; 10-12 meses =  $20,82 \pm 5,35$  ng/ml; 14-18 meses =  $5,62 \pm 3,78$  ng/ml) (Kevenaar *et al.*, 2006). También en las mujeres los valores de AMH son variables, aumentando progresivamente desde la infancia hasta la adolescencia media con valores promedios de 4,7 ng/ml y luego decaen hasta niveles indetectables en mujeres menopáusicas, además la asociación con la población folicular durante estas etapas resulta ser mayor que otros marcadores endócrinos como la FSH, inhibina o estradiol (Zylbersztein, 2008). De la misma manera en ovejas la correlación resultó ser muy alta ( $r=0,96$ ;  $P<0,001$ ), con niveles promedios de AMH de  $0,93 \pm 0,42$  ng/ml (Torres, 2012).

En el ganado bovino la concentración de AMH es muy variable (0,025–0,228 ng/ml), sin embargo, se ha estimado que es alrededor de 10 veces menos que en los humanos, a pesar de esto se ha visto que existe una buena correlación con el RFA ( $r=0,79$ ;  $P<0,001$ ) (Rico *et al.*, 2009; Rico *et al.* 2012), lo que puede ser un marcador confiable para estimar la población de folículos antrales y por lo tanto predecir la respuesta superovulatoria en el ganado (Monniaux *et al.*, 2010; Mossa *et al.*, 2017).

Se ha considerado que la AMH cumple dos funciones principales:

- 1.) Inhibición del crecimiento de folículos primordiales evitando así un agotamiento temprano de la reserva folicular ovárica.
- 2.) Modulador folicular mediante la reducción de la capacidad de respuesta a FSH de los folículos de la zona preantral.

### **3.9.1. Hormona Antimülleriana en humanos.**

En las mujeres los niveles de AMH pueden variar en fases distintas a lo largo de la vida en la mujer, aumentan en la infancia y son estables hasta llegar a un pico a principios de los veinte años y teniendo posteriormente un descenso al llegar a la menopausia (Mossa *et al.*, 2017). Esto puede ser útil para: predecir la respuesta a la estimulación ovárica, evaluar estrategias de preservación de la fertilidad, detectar daño quirúrgico o posquimioterapia y diagnóstico de insuficiencia ovárica prematura, menopausia y el síndrome ovárico poliquístico (Dewailly *et al.*, 2014).

Actualmente se ha relacionado a los niveles de AMH con el rendimiento en la calidad de los ovocitos, por lo tanto, con las tasas de nacimientos vivos. Los hallazgos de



varios análisis retrospectivos a gran escala de mujeres sometidas a FIV encontraron una asociación positiva entre los niveles de AMH y las tasas de nacimientos vivos. Un estudio prospectivo reciente en cerca de 900 mujeres sometidas a 1230 ciclos de FIV confirmó estos hallazgos e informó que el nivel de AMH está fuertemente asociado con las tasas de embarazos y nacimientos vivos, independientemente de la edad y el rendimiento de los ovocitos. Sin embargo, otros estudios no han demostrado una asociación entre el nivel de AMH y las tasas de embarazo o nacidos vivos. Por lo tanto, la AMH puede ser útil para predecir las tasas de embarazo y de nacidos vivos, pero aún se necesitan más análisis prospectivos (Fleming *et al.*, 2015).

### **3.9.2. Hormona Antimülleriana en el ganado bovino.**

En la vaca la AMH se encuentra en los folículos preantrales, folículos antrales pequeños en crecimiento, así como en las células del *cumulus oophorus*. Pero resulta ser indetectables en los folículos primordiales antes de la activación de su crecimiento. Se ha encontrado que en los rumiantes la concentración de AMH disminuye marcadamente cuando incrementa el tamaño del folículo, teniendo grandes concentraciones de AMH en folículos entre 3-7 mm y bajas concentraciones en folículos >7 mm de diámetro (Mossa *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que las concentraciones circulantes de AMH varían fisiológicamente desde el nacimiento hasta la pubertad. En terneras *Bos taurus* se ha visto que las concentraciones de AMH aumentan durante los primeros 2 meses de edad (0,48 ng/ml), disminuyen a los 5 (0,42 ng/ml) y son estables a partir de los 8 a 9 meses desde el nacimiento (0,18 ng/ml), aproximadamente en el momento de la primera ovulación. Un patrón similar se muestra en el ganado Maine-Anjou, con concentraciones de AMH que incrementan rápidamente entre 1 y 3 meses de edad (185 pg/ml), se mantiene a los 6 meses (170 pg/ml) y decrece hasta los 12 meses de edad (120 pg/ml). Por lo tanto se ha considerado que en el ganado se incrementa la concentración de AMH en los primeros meses de vida pero produce una disminución al momento de llegar a la pubertad (Monniaux *et al.*, 2013; Mossa *et al.*, 2017).

### **3.9.3. Factores que afectan la AMH.**

#### **3.9.3.1. Nutrición, lactación y enfermedad.**

El ambiente encontrado en la vida fetal influye directamente sobre el desarrollo, función fisiológica y riesgo de enfermedades en el ganado adulto. El estado nutricional se considera una causa fundamental que influye en el desarrollo fetal,



tanto la desnutrición materna como la sobre nutrición reducen en desarrollo de la reserva ovárica y a su vez las concentraciones circulantes de AMH en la descendencia. Las vacas lecheras con un alto número de células somáticas (SCC) en la leche, un índice de infección crónica de la glándula mamaria, produjeron hijas con concentraciones reducidas de AMH en la etapa adulta (Ireland *et al.*, 2011). Estos resultados, implican que la infección mamaria persistente en la madre durante la gestación no solo puede perjudicar su producción de leche sino que también puede tener un impacto negativo a largo plazo en el potencial reproductivo de su hija (Mossa *et al.*, 2017).

### **3.9.3.2. Envejecimiento.**

Se considera en mujeres a la AMH como un excelente indicador clínico del envejecimiento ovárico en mujeres. Ya que viene correlacionado al igual que el RFA con la reserva ovárica que disminuye con la edad. En un estudio realizado en vacas Holstein primíparas y multíparas no se informó correlación entre el número de pariciones y la concentración de AMH. Mientras que en otro estudio realizado por Ribeiro *et al.*, (2014) se observó concentraciones más altas de AMH en la segunda y tercera lactancia en comparación con la primera y cuarta en las que la AMH plasmática fue más baja. Esto indica que se deben realizar más estudios para confirmar si existe correlación verdadera entra la AMH y el envejecimiento.

### **3.9.3.3. Raza.**

Muchos estudios han indicado que la concentración de la AMH resulta ser menor en razas lecheras (*Bos taurus*) a comparación con razas de carne (*Bos indicus*) como lo demuestra Baldrighi *et al.*, (2014) en su estudio el cual presenta una correlación positiva entre RFA y la concentración sérica de AMH en Gyr, Holstein y Búfalos. Siendo la raza Gyr la que tuvo un mayor RFA ( $60 \pm 12,2$ ) y por lo tanto una mayor concentración de AMH ( $0,60 \pm 0,12$  ng/ml), las vacas Holstein tuvieron una menor concentración de AMH ( $0,24 \pm 0,06$  ng/ml; RFA de  $35,9 \pm 6,8$ ) que las vacas Gyr.

### **3.9.3.4. Células de la granulosa.**

En un estudio realizado por Mossa *et al.*, (2017) para determinar la capacidad de respuesta por parte de las células de la granulosa frente a la FSH, determinaron que las células de la granulosa en el ganado con un bajo RFA fueron refractarios a la acción de la FSH y, en consecuencia, produjeron menos AMH en comparación con las células de la granulosa del ganado con un alto RFA. Esto puede explicarse



debido a que las altas concentraciones de FSH inhiben la expresión del gen de AMH (BMP4 y BMP6) (Monniaux *et al.*, 2013).

### **3.10. Utilidad de la Hormona Antimülleriana.**

La concentración sérica de AMH en el ganado adulto resulta ser relativamente constante, sin presentar variaciones significativas en el ciclo estral o incluso en la sincronización de celo. Por lo que puede ser un biomarcador confiable que refleja el RFA, tamaño del ovario y la cantidad total de folículos y ovocitos en ovarios de los bovinos (Ireland *et al.*, 2011).

#### **3.10.1. Hormona Antimülleriana y respuesta superovulatoria.**

En vacas productoras de carne se puede asociar la respuesta superovulatoria con la concentración sanguínea de AMH, ya que se obtuvo que las vacas con mayor número de folículos de 3–5 mm al comienzo de la superovulación tienen mayor concentración sérica de AMH (0,364 – 0,898 ng/ml), resultando este mismo grupo de vacas con una mayor cantidad de cuerpos lúteos palpables en promedio de 20,54 ± 1,6 (Center *et al.*, 2018).

En vacas Holstein también se ha informado que la AMH puede ser utilizada como un marcador para seleccionar donadoras que pueden tener una buena respuesta a SOV (Rico *et al.*, 2012), teniendo una correlación positiva ( $r=0,64$ ,  $P<0,001$ ) entre la concentración de AMH y la cantidad de CL luego de la aplicación del tratamiento hormonal para inducir la superovulación, siendo los animales con (Rico *et al.*, 2009).

#### **3.10.2. Hormona Antimülleriana y producción de embriones.**

La producción de embriones *in vivo* por MOET puede sufrir variaciones por diferentes circunstancias, ya sea en la respuesta superovulatoria, supervivencia de los ovocitos en el tracto reproductivo, transporte y supervivencia de los espermatozoides, entre otros (Becaluba, 2007). Por lo tanto, el número de embriones obtenidos no representa el número de ovulaciones como tal. Es así que la concentración plasmática de AMH (100 – 200 pg/ml), medida en donadoras varios meses antes de su ingreso en el protocolo de producción de embriones, se correlacionó con el número promedio y máximo de embriones recolectados ( $r=0,58$ ,  $P=0,0001$ ), permitiendo considerar la medición del nivel endocrino de AMH como un procedimiento simple y predictivo para evaluar la capacidad de producción de un número alto o bajo de embriones por parte de una donante potencial (Monniaux *et al.*, 2010).



### **3.11. Determinación de AMH mediante test de ELISA.**

Para la determinación de concentraciones de hormonas en la circulación, la técnica de ELISA es la más utilizada. Existen varias formas de realizar la técnica, sin embargo, para determinar la concentración sérica de AMH, ELISA tipo sándwich es la de mayor utilidad; esta técnica utiliza dos anticuerpos reactivos con diferentes epítopes del antígeno que se pretende determinar (Abbas *et al.*, 2012).

Para realizar la técnica se prepara la superficie del pocillo una cantidad conocida del anticuerpo para identificar el antígeno buscado. Luego se agrega un anticuerpo específico primario que cumple la función de “emparedar” el antígeno. Se agrega anticuerpos secundarios ligados a enzimas para que se unan al anticuerpo primario. Posterior a esto se realiza un lavado para eliminar el anticuerpo-enzima conjugados sin consolidar. Finalmente se agrega el sustrato que se convierte en un color que se puede cuantificar (Gan & Patel, 2013).



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1. Materiales.

Como material biológico se utilizaron vacas de raza Holstein mestizas, de las cuales se tomaron muestras de sangre con tubos y agujas Vacutainer<sup>®</sup>, para la preparación y conservación de las muestras se utilizó una centrífuga y una congeladora calibrada a -20°C. La determinación de los niveles de hormona Antimülleriana se realizó mediante la prueba de ELISA con el kit “DL-AMH-b” de DEVELOP<sup>®</sup>. Para el proceso de sincronización de la onda folicular se utilizó un dispositivo intravaginal de liberación lenta de progesterona (CIDR<sup>®</sup> 1,3g; Zoetis, Perú), benzoato de estradiol (Gonadiol<sup>®</sup> 1mg/ml; Zoetis, Perú), progesterona inyectable (Progesterona<sup>®</sup> 25 mg/ml; Erma S.A, Colombia), un agente luteolítico como: Dinoprost Trometamina 25 mg (Lutalyse<sup>®</sup>) y GnRH<sup>®</sup> (Gonadorelina 500 mcg Vehículo, c.b.p. 5 ml; Merck, USA). La superovulación se llevó a cabo con FSH (V-Folltropin<sup>®</sup>, FSH equivalente a 400 mg NIH-FSH-P1; Vetoquinol, Brasil). Momentos antes del lavado de embriones se realizó la limpieza de la parte posterior del animal con una mezcla al 10% de agua y amonio cuaternario. El proceso de asepsia, tranquilización y bloqueo se ejecutó con alcohol desinfectante al 70%, xilacina 2% y lidocaína 2% respectivamente. La colección de embriones se realizó con un sistema de lavado de doble vía, sonda Foley 16” (Agtech<sup>®</sup>), mandril, dilatador, medio de lavado (ViGRO<sup>™</sup> complete flush), jeringas y filtro Em-con (Agtech<sup>®</sup>). Una vez colectados los embriones se llevaron al laboratorio para su valoración en un estereoscopio de 50x; además, para la manipulación se usaron pipetas y cajas Petri de búsqueda. Para la valoración de la SOV utilizamos un ecógrafo, con sonda lineal de 7,5 Hmz.

## 4.2. Métodos.

### 4.2.1. Área de estudio.



**Figura 13:** Mapa de la ubicación del área de estudio.

**Fuente:** Instituto geográfico militar del Ecuador (1999).

La investigación se realizó en ganaderías lecheras que se encuentran dentro de las provincias de Azuay y Cañar manejadas al pastoreo en un piso altitudinal sobre los 2.500 msnm.

La provincia del Azuay está constituida por 15 cantones en los cuales existen 27 parroquias urbanas y 60 parroquias rurales. Posee dos estaciones: la seca y húmeda debido a la fragmentación geográfica que ocasiona la cordillera de los andes, por lo que la región occidental tiene temperaturas que oscilan entre los 20°C y 33°C y la zona andina su temperatura puede variar de los 10°C a 28°C. Azuay representa el 4,92% de la superficie de labor agrícola a nivel nacional donde se encuentran alrededor de 430.000 cabezas de bovinos de los cuales 94.961 vacas son ordeñadas, produciendo 482.401 litros de leche diarios que representa cerca de 5,07 litros de leche por vaca (INEC, 2011; Ortega et al., 2017).

La provincia de Cañar se divide en 7 cantones que presentan pisos climáticos similares al Azuay por lo que su clima y temperatura son muy parecidos. Representa el 1,93% de la labor agropecuaria del país, contando con 149.624 bovinos de los

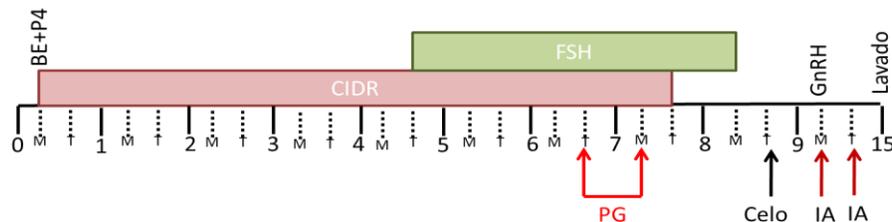
cuales 50.669 son vacas ordeñadas diariamente, siendo la quinta provincia con mayor producción de leche contando con 324.578 litros de leche producidos diariamente ( INEC, 2011; Argudo, 2016).

#### 4.2.2. Metodología de la investigación.

Un grupo de 44 vacas de raza Holstein mestiza con un peso vivo promedio de  $553,81 \pm 12,120$  Kg, condición corporal de  $3,03 \pm 0,035$ , escala de 1-5, edad  $6,19 \pm 0,25$  años, multíparas (2-5 partos; promedio  $3,17 \pm 0,18$  partos), producción promedio diaria de  $18,33 \pm 0,87$  litros, cíclicas, sanas, sin problemas reproductivos. Todas las donadoras seleccionadas se encontraban mínimo 60 días de post parto y criadas en ganaderías bajo sistema pastoril sobre los 2500 msnm. Las vacas que presentaron alguna complicación en el protocolo de SOV fueron descartadas del trabajo (n=8).

##### 4.2.2.1. Protocolo de superovulación.

A las donadoras, se aplicó un protocolo de SOV (**Fig. 14**), que inició en el día cero con la colocación de un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (CIDR® 1,3 g) más la aplicación intramuscular profunda de 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol®) y 50 mg de progesterona inyectable (Progesterona®) a las 06h00. A partir del día cuatro en la tarde (18h00) los animales recibieron aplicaciones cada 12 horas de FSHp (V-Folltropin®) de forma decreciente: día 4 (18H00=60mg), día 5 (06h00=60mg; 18h00=40mg), día 6 (06h00=40mg; 18h00=30mg), día 7 (06h00=30mg; 18h00=20mg), día 8 (06h00=20mg). Adicionalmente, en el sexto (18h00) y en el séptimo día (06h00) se aplicó 25 mg de un agente luteolítico a base de Dinoprost Trometamina (Lutalyse®). En el octavo día (18h00) se observó la presencia de celo en las vacas, mediante un parche detector de celo (EstroTECT®), colocado en la región lumbar el día 7 del protocolo. En el día nueve (06h00), se realizó la primera inseminación artificial (IA) más la aplicación de 0,25mg de Gonadorelina (GnRH®) y a las 18h00 se ejecutó una segunda inseminación.



**Figura 14:** Protocolo de sincronización, superovulación y colección de embriones.

**Fuente:** Los autores.



#### 4.2.2.2. Ultrasonografía en los animales.

La valoración de los ovarios se realizó con un ecógrafo portátil provisto de una sonda lineal de 7,5 MHz, en tres momentos del protocolo de SOV.

La primera al inicio del protocolo de SOV (día 0), para determinar el recuento de folículos antrales (RFA) de cada animal. Posteriormente, en el día nueve previo a la primera inseminación artificial se realizó la segunda ecografía de ambos ovarios para estimar la respuesta superovulatoria, contabilizando el número de folículos preovulatorios (>8mm) y tomando un promedio del tamaño de dichos folículos.

Para valorar la respuesta a la ovulación, se cuantificó el número de cuerpos lúteos y folículos sin ovular presentes en los ovarios en el día 15, luego del lavado de las donadoras.

#### 4.2.2.3. Recolección de embriones.

Las donadoras fueron colocadas en una manga con sus respectivas consideraciones de bioseguridad tanto para el operador como para el animal. La parte posterior del animal fue lavada con agua y desinfectada con una solución de amonio cuaternario al 10%. Luego del proceso aséptico, se realizó la insensibilización y tranquilización por vía epidural (última sacra y primera coccígea) en las donadoras mediante una mezcla de lidocaína al 2% (Roxicaina<sup>®</sup>) y xilacina al 2% (Dormi-xyl<sup>®</sup>).

Los embriones fueron colectados siete días después de la inseminación artificial en las donadoras mediante una técnica no quirúrgica, para lo cual se utilizó un sistema de circuito abierto con flujo continuo, que permitió ubicar la sonda en la curvatura mayor de los cuernos uterinos y con el medio ViGRO complete flush (ViGRO<sup>™</sup>) se lavaron los cuernos por separado. Los embriones se colectaron en un filtro Em-con<sup>®</sup> de 75 µm, para ser trasladados al laboratorio ambulante, en donde se procedió a realizar la búsqueda, colocando el contenido del filtro en una caja Petri, y mediante un estereoscopio de 50x a 100x, se logró identificar estructuras, siendo determinados su grado de desarrollo y calidad de acuerdo con los parámetros establecidos por la International Embryo Transfer Society (2010) (**Tabla 1 y 2**).



**Tabla 1:** Descripción del desarrollo de los embriones al momento de la colecta en el día 7. Adaptado de: Phillips & Jahnke (2016).

<b>Estadio de desarrollo</b>		
<b>Código</b>	<b>Estado</b>	<b>Descripción</b>
1	<b>No fertilizado</b>	Usualmente tiene una membrana vitelina esférica; el citoplasma aparece granular y tiene un espacio perivitelino amplio. Sin embargo, pueden presentarse de apariencia muy fragmentada que puede confundir al técnico.
2	<b>2 – 12 células</b>	Estos embriones contienen de 2 a 12 células que han demorado su desarrollo y pueden ser considerados muertos o degenerados.
3	<b>Mórula temprana</b>	Se ha dividido en 16 o más células al día 7 y sus blastómeros son difíciles de distinguir entre sí.
4	<b>Mórula</b>	Blastómeros individuales han formado una masa celular compacta, pero estas células todavía no se diferencian.
5	<b>Blastocisto temprano</b>	Una cavidad llena de líquido llamado blastocele comienza su formación dentro de la masa celular. La cavidad del blastocele permite a los blastómeros diferenciarse en células del trofoblasto y la masa celular interna.
6	<b>Blastocisto</b>	Se puede definir claramente el blastocele, las células de trofoblasto y la masa celular interna.
7	<b>Blastocisto expandido</b>	La característica más destacada es el aumento en el diámetro general embrionario y un adelgazamiento de la zona pelúcida.
8	<b>Blastocisto eclosionado</b>	El embrión está empezando a eclosionar o está completamente eclosionado a través de una grieta de la zona pelúcida. Los embriones en esta fase pueden colapsar creando una apariencia diferente.
9	<b>Blastocisto eclosionado expandido</b>	Los embriones en esta etapa estarán eclosionados de la zona pelúcida y se volverán a expandir.

**Tabla 2:** Descripción de la calidad de los embriones recolectados al día 7. Adaptado de: Phillips & Jahnke (2016).

Calidad del embrión		
Código	Calidad	Descripción
1	<b>Excelente o bueno</b>	Las irregularidades son relativamente menores, cerca del 85% de la masa celular está integra y tiene una masa viable. Son aptos para la congelación.
2	<b>Regular</b>	Presenta moderadas irregularidades en la forma de la masa celular o el tamaño del embrión. Al menos el 50% del material celular debe estar intacto. Estos embriones resisten menos a la congelación que los de calidad 1, pero son aptos para transferir en fresco.
3	<b>Malo</b>	Contiene irregularidades importantes en la forma de la masa celular o en el tamaño, color y densidad. Por lo menos el 25% del material celular debe estar intacto. Estos embriones no se pueden congelar y tienen menos probabilidades de implantación.
4	<b>Degenerado</b>	Se incluye embriones degenerados, ovocitos no fertilizados, embriones de 2 – 12 células o no viables.

#### 4.2.2.4. Determinación de la concentración sérica de la Hormona Antimülleriana (AMH).

Para determinar la concentración de la AMH en plasma, se procedió a tomar muestras sanguíneas de cada una de las donadoras al inicio del protocolo de SOV. Para esto se utilizó tubos Vacutainer® con EDTA como anticoagulante, mediante punción de la vena coccígea media. Inmediatamente se guardaron las muestras en un cooler con gel refrigerante (5°C) para su transporte al laboratorio clínico de la facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, en donde los tubos con sangre fueron centrifugados a 3000 rpm durante 20 minutos. El plasma obtenido fue congelado a -20°C, hasta su posterior análisis.

La concentración de AMH fue determinada mediante una prueba de ELISA tipo sándwich, con el kit DL-AMH-b (Develop®), midiendo la intensidad del color mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 450 nm, estableciendo la concentración de AMH por comparación de la densidad óptica de las muestras con la curva estándar. El kit tiene una sensibilidad inferior a 0,117 ng/ml. Precisión intra-ensayo: CV <10% e inter-ensayo: CV <12%.



#### 4.2.2.5. Diseño experimental.

La investigación es de tipo descriptiva-cuasi experimental. En un primer momento se describió los niveles de hormona Antimülleriana que poseían cada una de las 36 vacas de raza Holstein mestizas, al mismo tiempo se realizó el recuento de folículos antrales presentes en los dos ovarios de cada una de las vacas en estudio.

En una segunda instancia con los valores de AMH obtenidos en el ensayo, inicialmente en el anteproyecto se propuso la realización de dos grupos: animales con alto y bajo nivel de AMH. Sin embargo, a decir de autores como Rico *et al.*, (2012); Ribeiro *et al.*, (2014); Souza *et al.*, (2015), al realizar dos grupos (alto y bajo), en base al valor promedio del total de animales, se corre el riesgo de tener resultados contradictorios.

Por lo tanto, estos autores recomiendan la utilización de terciles o cuartiles para lograr una mejor categorización de la muestra y tener dos valores extremos que representen correctamente al grupo con alto y bajo nivel de AMH, quedando en el centro los animales con valores medios (medio), grupo en el cual se encontraran los animales con valores combinados de los grupos de alto y bajo nivel. Por tal motivo, se decidió utilizar esta metodología para categorizar las donadoras en animales con alto y bajo nivel de AMH, obteniendo un grupo adicional (medio) el cual fue analizado también en el presente trabajo.

A todos los animales seleccionados (alta, media y baja) se les aplicó el mismo protocolo de superovulación (SOV), con el fin de evaluar la respuesta a la SOV expresada en número de folículos >8 mm presentes en el día de la IA, cantidad de CL al momento de la colecta, y número y calidad de embriones obtenidos en los grupos.

#### 4.2.2.6. Análisis estadístico.

Los resultados fueron tabulados en Excel y analizados mediante el programa estadístico SPSS versión® 25. Se determinaron estadígrafos principales generales. Mediante la prueba de Shapiro Wilk se estableció normalidad de los datos. Para determinar los grupos de alta, media y baja concentración de AMH se realizaron terciles. Para comparar los grupos se ejecutó la prueba de ANOVA y para comparar las medias se utilizó Tukey al 5%. La correlación se estableció mediante la prueba de Pearson.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1. Resultados generales de las variables en estudio de los 36 animales.

De los 44 animales que fueron seleccionados para entrar en el estudio, 8 se descartaron por presentar problemas sanitarios durante el protocolo de superovulación (SOV); por lo tanto, al final se trabajó con 36 vacas.

El promedio general ( $n=36$ ) de la hormona Antimülleriana (AMH) fue de  $0,06 \pm 0,02$  ng/ml. La cantidad de folículos antrales ( $\geq 4$  mm) presentes en los ovarios (RFA) al inicio del protocolo de SOV fue de  $15,08 \pm 4,5$  folículos. Si bien la respuesta a la superovulación por parte de las donadoras fue muy variable, se obtuvo una media de  $17,06 \pm 5,61$  folículos preovulatorios  $>8$  mm. Finalmente, el número de embriones transferibles promedio fue de  $3,36 \pm 3,15$  (**Tabla 3**).

Rico *et al.*, (2009), establecieron que los niveles de AMH en vacas Holstein (4–9 años de edad) al momento de iniciar el protocolo de superovulación (día 0) se encontraban entre 0,025 a 0,228 ng/ml, estos valores son mayores a los determinados en el presente trabajo (rango entre 0,01 a 0,11 ng/ml), se considera que la diferencia entre los niveles de AMH detectados en los dos estudios podría ser explicado por el tipo de kit de Elisa utilizado para valorar la AMH; así Rico *et al.*, utilizaron el kit DSL, Cergy-Pontoise, France, testado para líquido folicular bovino y en este caso se utilizó el kit de ELISA tipo sándwich, DL-AMH-b (Develop<sup>®</sup>), China.

En lo que respecta al RFA autores como Gobikrushanth *et al.*, (2017), establecieron un rango de 10 a 53 folículos antrales en el día cero del protocolo de SOV, si bien estos valores están por encima de los determinados en el presente estudio (8 a 26 folículos antrales), la diferencia podría ser consecuencia de la metodología de valoración del RFA utilizada en los dos estudios, Gobikrushanth *et al.*, contaron todos los folículos antrales  $>2$  mm y en este trabajo se consideró folículos  $>4$  mm.

El número de embriones transferibles obtenidos en esta investigación (3,36 embriones transferibles/lavado) se encuentra muy por debajo de lo descrito a nivel internacional por investigadores como (Viana, 2018), quien en su análisis del avance de esta biotecnología determina la media de 6,4 embriones transferibles/lavado; sin embargo, es importante distinguir que se hablan de promedios comerciales donde se utilizan donadoras seleccionadas minuciosamente, lo que no sucedió en el presente trabajo ya que por la naturaleza del estudio se tuvo que superovular vacas con alto y bajo RFA, lo cual disminuyó la posibilidad de tener mejores resultados, esto es corroborado por Sevgi *et al.*, (2019) quienes realizan un estudio en *Bos taurus* (Simmental), en el cual valoran la relación de la AMH y la respuesta a la SOV,

llegando a determinar un promedio de embriones transferibles de 3,21, similar al obtenido en el presente trabajo.

**Tabla 3:** Valores descriptivos de los niveles de Hormona Antimülleriana (AMH), el Recuento de Folículos Antrales (RFA), el número de folículos presentes en el día de valoración de la SOV y el número de embriones transferibles, obtenidos en los 36 animales en estudio.

Variable	N	$\bar{X}$	DE	Valores		Terciles		
				Mínimo	Máximo	25%	50%	75%
Hormona Antimülleriana (AMH)	36	0,06	0,02	0,01	0,11	0,05	0,06	0,07
Recuento de folículos antrales (RFA)	36	15,08	4,50	8,00	26,00	12,00	14,00	17,75
Recuento de folículos SOV	36	17,06	5,61	7,00	31,00	12,00	18,00	20,00
Número de embriones transferibles	36	3,36	3,15	0,00	11,00	1,00	2,00	5,75

N=número de casos.  $\bar{X}$ =media del valor. DE=desviación estándar. Recuento de folículos encontrados como respuesta a la superovulación (SOV).

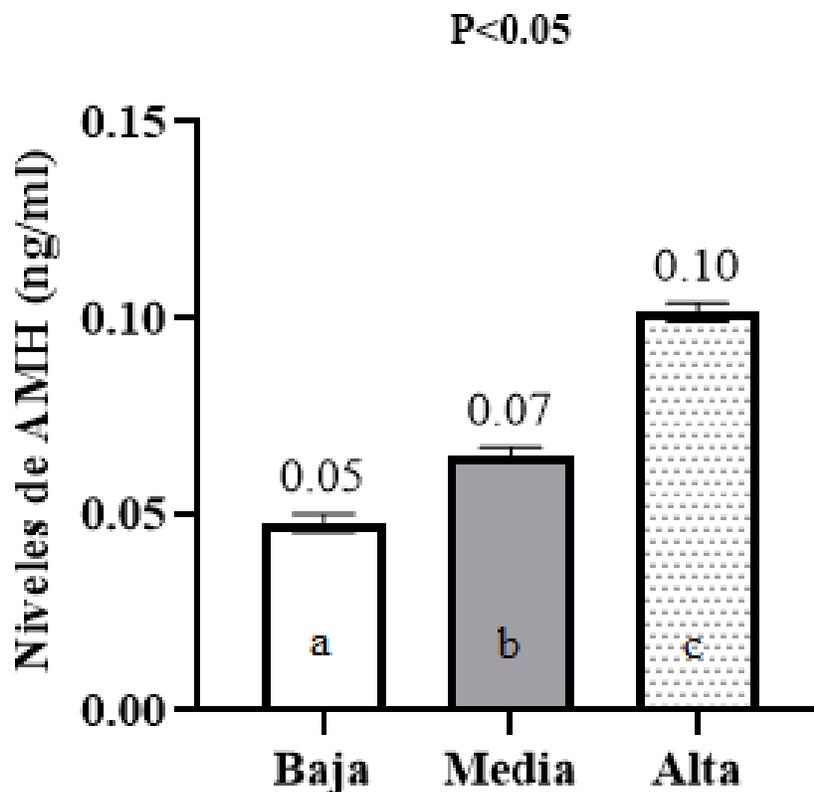
## 5.2. Resultados de los grupos de alta, media y baja concentración de AMH.

En forma general la variación en la concentración de AMH encontrada en los 36 animales en estudio fue alta, teniendo valores mínimos de 0,01 ng/ml y máximos de 0,11 ng/ml (**Tabla 3**).

Para realizar el análisis de la relación de la AMH, RFA y la respuesta al proceso de SOV, en la presente investigación se realizaron tres grupos de animales de acuerdo con los niveles plasmáticos de AMH (alto, medio y bajo), para lo cual se emplearon terciles. Para comparar los valores promedios de cada grupo se ejecutó la prueba de Tukey al 5%, determinando que el rango y promedio en el grupo alto fue de 0,10 a 0,11 ng/ml, media de  $0,10 \pm 0,002$  ng/ml, grupo clasificado como medio (0,06 a 0,08 ng/ml) valor promedio de  $0,07 \pm 0,001$  ng/ml y grupo bajo (0,01 a 0,05 ng/ml), con un promedio de  $0,05 \pm 0,002$  ng/ml, con diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) entre los grupos (**Figura. 15**).

Autores como Souza *et al.*, (2015), realizaron una clasificación de los animales utilizados en su ensayo similar al propuesto por nosotros, basados en el nivel de

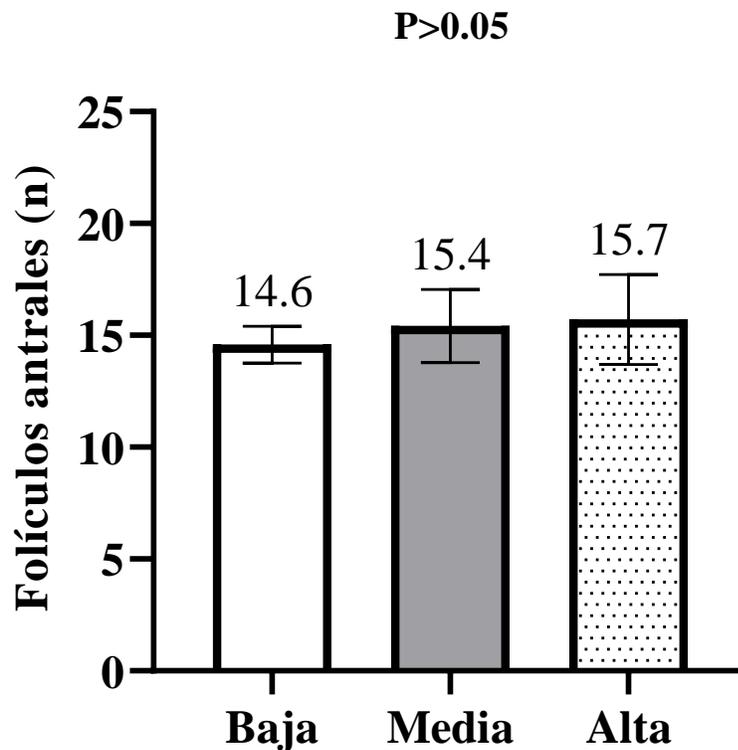
concentración de la AMH y determinaron dos grupos en su trabajo: el primero vacas con bajo nivel de AMH (44,9 pg/ml= a 0,045 ng/ml) y alto nivel (243,1 ng/ml= a 0,243 ng/ml), se puede observar que el grupo considerado de bajo nivel de AMH en los dos trabajos son similares; sin embargo, el grupo clasificado como alto en el experimento de Souza *et al.*, presentaron el doble de AMH respecto al mismo grupo del presente estudio, esta diferencia exclusivamente en el grupo de alta concentración de AMH podría ser explicado por las condiciones de mantenimiento (intensivo vs extensivo), alimentación (dieta concentrada vs pastoreo), el nivel de producción (>30L vs 18,4L) y la edad de los animales (primíparas vs multíparas) utilizados en los dos experimentos.



**Figura 15:** Valores promedios y error estándar de la Hormona Antimülleriana en los grupos clasificados como de baja, media y alta concentración, según la concentración de AMH. Prueba de Tukey al 5%. abc=diferencia estadística entre grupos.

### 5.3. Recuento de Folículos Antrales.

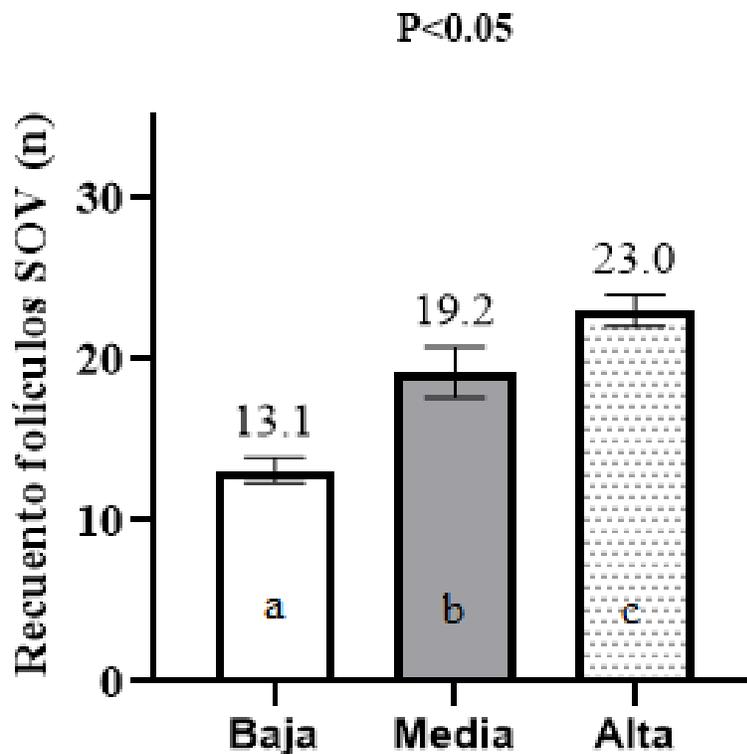
El número de folículos antrales obtenidos al inicio del protocolo de SOV no tuvo diferencia significativa ( $P>0,05$ ) entre los grupos baja ( $14,6 \pm 3,37$  folículos), media ( $15,4 \pm 5,63$  folículos) y alta ( $15,7 \pm 5,31$  folículos) de AMH; además, el valor de correlación entre el RFA y la AMH ( $r=0,06$ ;  $P>0,73$ ) fue muy bajo y no significativo (**Fig. 16**). Sin embargo, hay autores como Gobikrushanth *et al.*, (2017), que describen una correlación positiva ( $r=0,54$ ;  $P<0,05$ ) entre estas dos variables. La explicación a estos resultados contradictorios podría estar en que Gobikrushanth *et al.*, utilizaron animales nulíparas y múltiparas y midieron todos los folículos  $\geq 2$  mm, a diferencia del presente trabajo en el cual se utilizó únicamente vacas y se contó los folículos  $\geq 4$  mm. Es importante indicar que Gobikrushanth *et al.*, mencionan que cuando se realiza el RFA en el momento de reinicio de la onda folicular la correlación entre RFA y la AMH aumenta ( $r=0,59$ ;  $P<0,05$ ) y es un valor más específico.



**Figura 16:** Valores promedios y error estándar del recuento de folículos antrales (RFA), en los grupos clasificados como de baja, media y alta, según los valores de AMH. Prueba de Tukey al 5%. abc=diferencia estadística entre grupos.

#### 5.4. Respuesta a la superovulación considerando el número de folículos presentes en la IA y el número de cuerpos lúteos al momento del lavado.

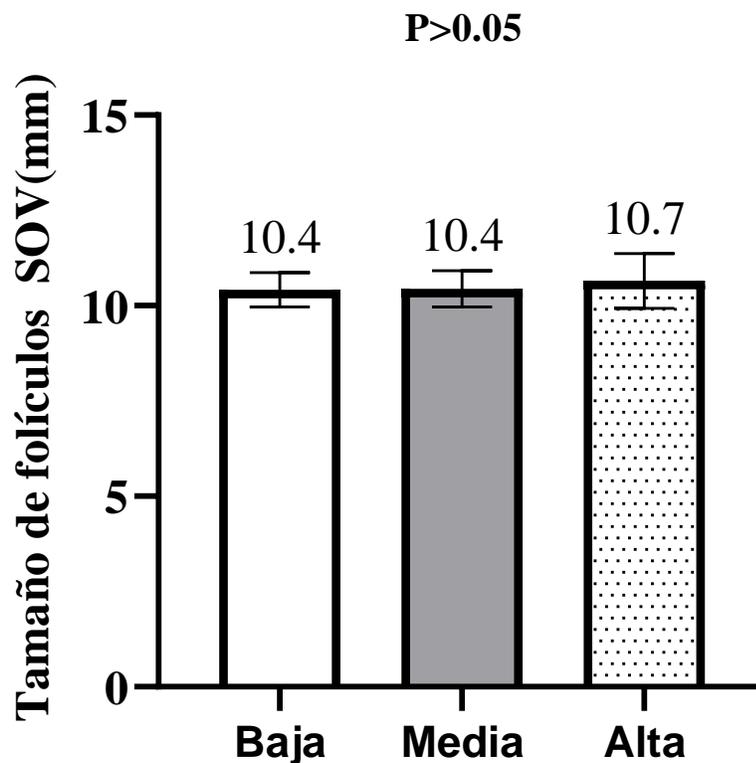
El número de folículos entre los grupos de baja ( $13,1 \pm 3,25$  folículos), media ( $19,2 \pm 5,45$  folículos) y alta ( $23 \pm 2,58$  folículos) concentración de AMH tuvieron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) (**Fig. 17**), mostrando una correlación positiva ( $r = 0,61$ ;  $P < 0,001$ ) entre el nivel plasmático de AMH y el número de folículos presentes en la respuesta superovulatoria (**Tabla 6**). Valores que guardan relación con lo descrito por Rico *et al.*, (2012), quienes establecen una correlación de  $r = 0,60$ ;  $P > 0,001$  entre los niveles de AMH y el número de folículos preovulatorios al momento de que las donadoras expresaron celo. Otros trabajos que estudian la correlación de estas dos variables, pero en ganado de carne describen similar tendencia en la correlación positiva ( $r = 0,45$ ;  $P < 0,001$ ) y muy significativa (Center *et al.*, 2018).



**Figura 17:** Valores promedios y error estándar del recuento de folículos que se encontraron al momento de la valoración de la superovulación (SOV), en los grupos clasificados como de baja, media y alta, según los valores de AMH. Prueba de Tukey al 5%. abc=diferencia estadística entre grupos.

Al valorar el tamaño de los folículos preovulatorios (>8 mm), no se encontró diferencia significativa ( $P>0,05$ ) entre los grupos de alta ( $10,7 \pm 1,88$  mm), media ( $10,4 \pm 1,65$  mm) y baja ( $10,4 \pm 1,83$  mm) concentración de AMH (**Fig. 18**). Sin embargo, los tamaños promedios de los folículos disponibles para la ovulación en los tres grupos experimentales fueron mayores al tamaño determinado como necesario por Ginther (2016) para que tengan la capacidad ovulatoria en forma fisiológica (>8,5 mm). Por lo tanto, se considera que poseían el tamaño necesario para ovular.

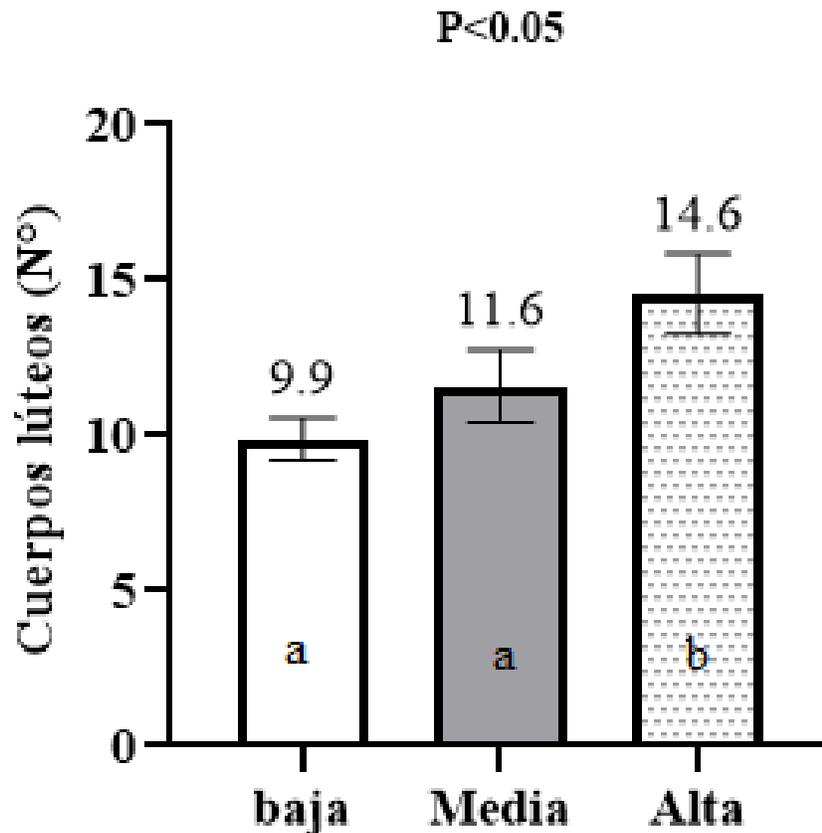
Además, es importante indicar que a pesar de que se trataban de folículos preovulatorios procedentes de un proceso de SOV, su tamaño fue apenas 2 mm menos que lo descrito por Ayala *et al.*, (2017), como valor promedio fisiológico del folículo preovulatorio en vaconas Holstein mestizas criadas en la sierra ecuatoriana, bajo sistemas pastoriles.



**Figura 18:** Valores promedios y error estándar del tamaño de los folículos que respondieron a la superovulación (SOV), en los grupos clasificados como de baja, media y alta, según los valores de AMH. Prueba de Tukey al 5%. abc=diferencia estadística entre grupos.

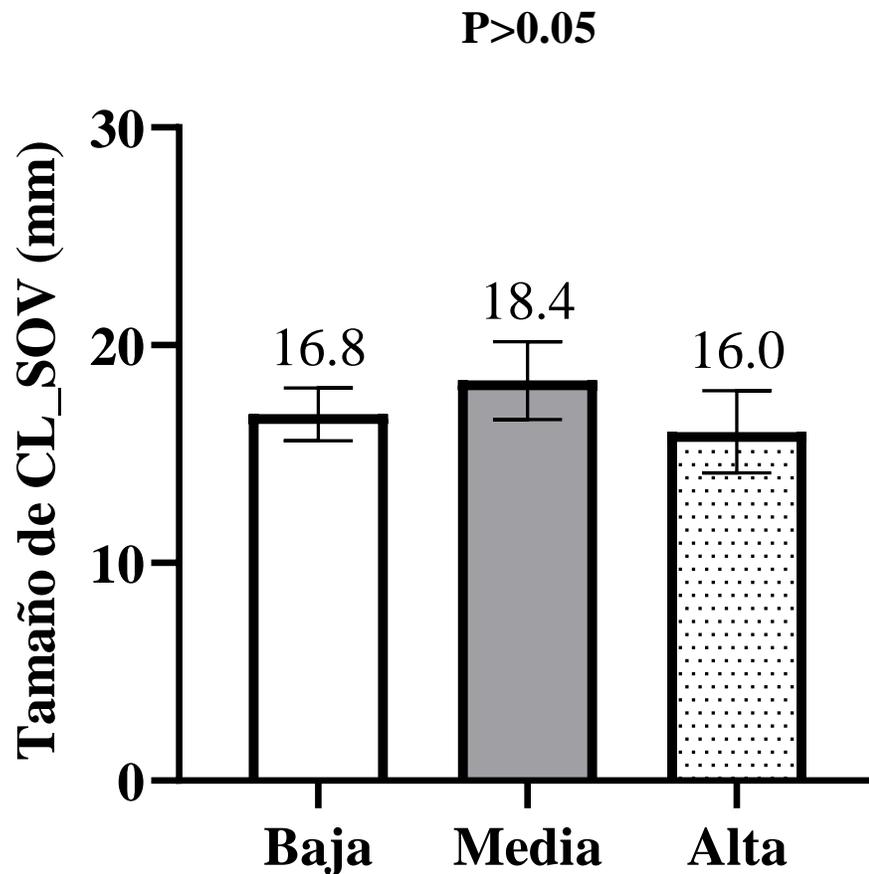
Al valorar la ovulación mediante el conteo de cuerpos lúteos presentes en los ovarios (**Fig. 19**), se evidencio diferencia significativa ( $P<0,05$ ) entre el grupo de alta concentración de AMH ( $14,6 \pm 3,4$  CL) con respecto a los grupos de media ( $11,6 \pm 4,05$  CL) y baja concentración ( $9,9 \pm 2,8$  CL). Con valores de correlación positiva entre el nivel de AMH con el número de cuerpos lúteos presentes al momento de colección de los embriones ( $r=0,46$ ;  $P<0,05$ ) (**Tabla 6**). Datos de correlación similares fueron determinados por Rico *et al.*, (2012), al valorar el número de CL vs la AMH en vacas Holstein multíparas ( $r=0,43$ ,  $P<0,01$ ). Similar tendencia fue descrita por Souza *et al.*, (2015) quienes establecieron un coeficiente de correlación del 65% ( $r=0,65$ ;  $P<0,01$ ) entre el nivel circulante de AMH y el número de CL.

Existen otros ensayos en ganado *Bos taurus* que describen correlaciones positivas y significativas entre número de CL y el nivel de AMH, como el de Center *et al.*, (2018), quienes determinan valores de ( $r=0,452$ ).



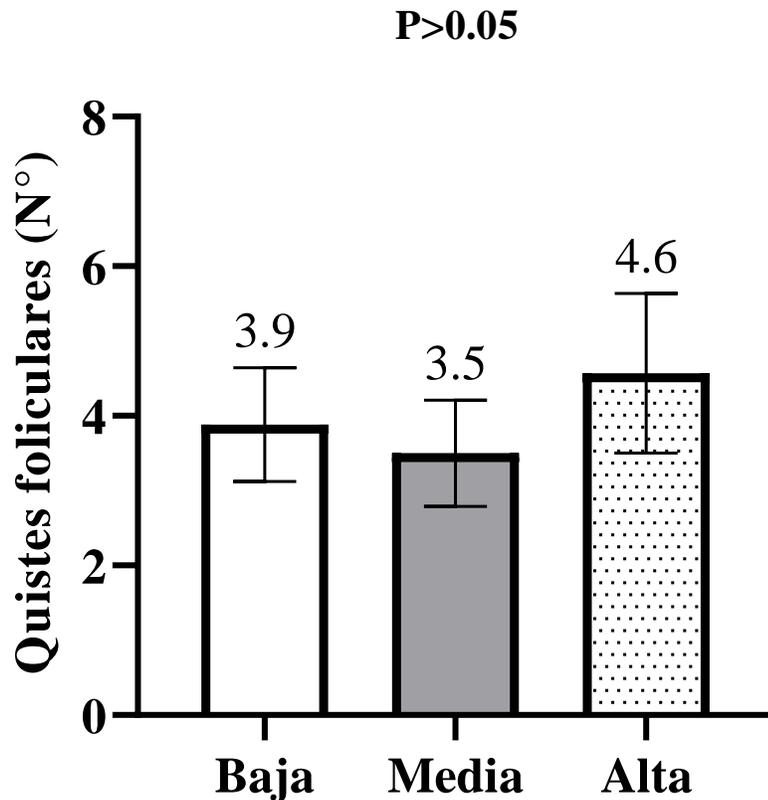
**Figura 19:** Valores promedios y error estándar del número de cuerpos lúteos que se observaron luego del proceso de superovulación (SOV), en los grupos clasificados como de baja, media y alta, según los valores de AMH. Prueba de Tukey al 5%. ab= diferencia estadística entre grupos.

Los tamaños de los cuerpos lúteos de los tres grupos (baja 16,8 mm; media 18,4 mm y alta 16 mm) no presentaron diferencia estadística ( $P>0,05$ ) (**Fig. 20**). Sin embargo, el tamaño del cuerpo lúteo de los animales de los tres grupos medido en el día 7 del ciclo estral, guardan relación con el tamaño del CL ( $16.9 \pm 0.98$  mm) del día 6 del ciclo estral, descrito en vaquillas Holstein mestizas criadas en el altiplano ecuatoriano (Ayala *et al.*, 2017)



**Figura 20:** Valores promedios y error estándar del tamaño de los cuerpos lúteos que se observaron luego del proceso de superovulación (SOV), en los grupos clasificados como de baja, media y alta, según los valores de AMH. Prueba de Tukey al 5%. abc=diferencia estadística entre grupos.

El número de folículos que no ovularon y que se hallaron presentes el día del lavado de embriones no presentaron diferencia estadística ( $P > 0,05$ ) entre los grupos de concentración de AMH: alta ( $4,6 \pm 2,82$  folículos), media ( $3,5 \pm 2,46$  folículos) y baja ( $3,9 \pm 3,14$  folículos) (**Fig. 21**).



**Figura 21:** Valores promedios y error estándar del número de folículos que no ovularon y fueron observados en la ecografía realizada antes de la inseminación artificial, en los grupos clasificados como de baja, media y alta, según los valores de AMH.



### 5.5. Recolección de embriones.

El número de estructuras recuperadas tuvo diferencia significativa entre los grupos de alta ( $10,2 \pm 4,04$  estructuras), media ( $3,4 \pm 0,5$  estructuras) y baja ( $4,2 \pm 1,04$  estructuras) concentración de AMH (**Tabla 4**).

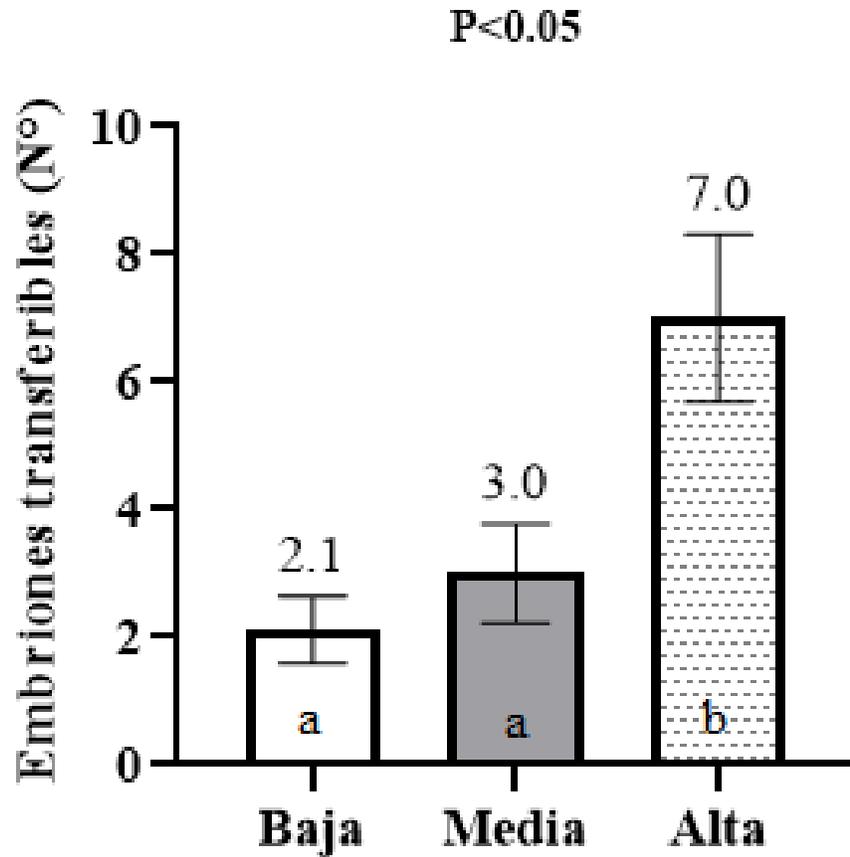
Al considerar solamente embriones transferibles existe una notable diferencia significativa entre los grupos de alta ( $7,0 \pm 1,31$ ) concentración de AMH con respecto a los grupos de media ( $3,0 \pm 0,78$ ) y baja ( $2,1 \pm 0,53$ ) (**Tabla 4; Fig. 22**). El coeficiente de correlación entre el grupo de alto nivel de AMH y el número de embriones transferibles recuperados fue significativo ( $r=0,55$ ,  $P<0,001$ ) (**Tabla 6**).

Sin embargo, el número de ovocitos no fecundados y el número de embriones degenerados obtenidos en los tres grupos no evidenciaron diferencia estadística (**Tabla 4**).

**Tabla 4:** Media y error estándar de los embriones obtenidos en los grupos clasificados como de baja, media y alta concentración de hormona Antimülleriana.

	Baja	Media	Alta
<i>Animales (n)</i>	17	12	7
<i>Total estructuras</i>	$4,2 \pm 1,04^a$	$3,4 \pm 0,50^a$	$10,2 \pm 4,04^b$
<i>No fecundados</i>	$0,5 \pm 0,26$	$0,2 \pm 0,11$	$0,3 \pm 0,19$
<i>Degenerados</i>	$0,8 \pm 0,46$	$0,4 \pm 0,15$	$3,2 \pm 2,95$
<i>Embriones transferibles</i>	$2,1 \pm 0,53^a$	$3,0 \pm 0,78^a$	$7,0 \pm 1,31^b$

Prueba de Tukey al 5%. ab=diferencia estadística entre grupos.



**Figura 22:** Valores promedios y error estándar del número de embriones transferibles obtenidos del proceso de superovulación (SOV), en los grupos clasificados como de baja, media y alta, según los valores de AMH. Prueba de Tukey al 5%. ab= diferencia estadística entre grupos.



De acuerdo con la calidad de los embriones transferibles obtenidos, se puede demostrar que se recuperaron mórulas de calidad 1 (excelente), 2 (buena) y 3 (regular); blastocistos tempranos de calidad 1 y 2; blastocistos de calidad 1, 2 y 3 y blastocisto expandido de calidad 1 (**Tabla 5**). Los embriones de mejor calidad se presentaron en el grupo de vacas con alta concentración de AMH, sobre todo con referencia a mórulas de calidad 1 y blastocistos de calidad 1 ( $P<0,05$ ).

**Tabla 5:** Media y error estándar de la calidad de los embriones obtenidos en los grupos clasificados como de baja, media y alta concentración de hormona Antimülleriana.

	Baja	Media	Alta
<i>Embriones transferibles</i>	2,1±0,53 <sup>a</sup>	3,0±0,78 <sup>a</sup>	7,0±1,31 <sup>b</sup>
<b>Calidad de los embriones:</b>			
<i>Mórula T1</i>	0,5±0,19 <sup>a</sup>	1,0±0,54 <sup>ab</sup>	2,9±1,28 <sup>b</sup>
<i>Mórula T2</i>	0,2±0,13 <sup>a</sup>	1,3±0,30 <sup>b</sup>	1,0±0,53 <sup>a</sup>
<i>Mórula T3</i>	0,1±0,08	0,3±0,18	0,3±0,28
<i>Blastocisto Temprano T1</i>	0,1±0,08	0,2±0,17	0,6±0,29
<i>Blastocisto Temprano T2</i>	0,4±0,15	-	0,1±0,14
<i>Blastocisto T1</i>	0,5±0,19 <sup>a</sup>	0,3±0,26 <sup>a</sup>	1,9±0,86 <sup>b</sup>
<i>Blastocisto T2</i>	0,3±0,14	-	0,1±0,14
<i>Blastocisto T3</i>	-	-	0,1±0,14
<i>Blastocisto expandido T1</i>	0,1±0,05	-	-

Prueba de Tukey al 5%. ab=diferencia estadística entre grupos.

A partir de estos resultados, se puede definir que la alta concentración plasmática de AMH influye directamente en el número y calidad de los embriones producidos por parte de las donadoras. Esto está estrechamente relacionado a que solo el 30% de los animales son responsables del 70% de los embriones transferibles producidos durante los programas de SOV (G. Bó & Mapletoft, 2014). En este estudio el grupo de alta concentración de AMH tuvo una media de 7 embriones transferibles, lo que también representa, que solamente el 20% de las vacas en estudio fueron buenas donadoras.



El nivel de AMH presente en sangre puede predecir la respuesta a la SOV y la cantidad de embriones, tal como lo menciona Rico *et al.*, (2012), demostrando una mayor producción de embriones en animales que presentaron un mayor nivel de AMH circulante ( $r=0,46$ ;  $P<0,01$ ). El punto de corte utilizado en la investigación de Rico *et al.*, fue de 74 pg/ml (0,074 ng/ml); los animales que se encontraban bajo este nivel presentaron una producción  $<10$  embriones colectados. Si bien estos resultados se aprecian superiores a los resultados obtenidos en este trabajo, se debe tomar en cuenta que Rico *et al.* (2012) habla de embriones colectados, mientras que en el presente estudio se hace referencia netamente a embriones transferibles. Además, factores como el manejo (intensivo vs extensivo) y alimentación (concentrado vs pastoreo) pueden tener relación directa con el número de embriones colectados.

En otro estudio, la relación entre la concentración de AMH y el número total de embriones transferibles fue casi 3 veces mayor en el grupo de alta concentración de AMH ( $244,1 \pm 14,3$  pg/ml) teniendo 7,2 embriones con respecto al grupo de baja concentración de AMH ( $44,9 \pm 6,9$  pg/ml) que presentaron solamente 3,1 embriones (Souza *et al.*, 2015). Estos resultados se asemejan a los obtenidos en esta investigación en los que el grupo de alta concentración de AMH presenta un promedio de 7 embriones, mientras que el grupo de baja concentración de AMH tiene un promedio de 2,1 embriones transferibles.

Si bien el coeficiente de correlación entre el nivel de AMH y el número de embriones transferibles, descrito por Souza *et al.*, es de  $r=0,28$  ( $P<0,02$ ) difiere al obtenido por este trabajo ( $r=0,55$ ;  $P<0,001$ ). Posiblemente esta diferencia se manifieste por factores externos que afecten la fecundación, ya que la correlación de Souza *et al.*, es más fuerte cuando se toma en cuenta el total de estructuras recuperadas ( $r=0,50$ ;  $P<0,01$ ).

Otros trabajos que guardan similitud con los resultados obtenidos en el presente estudio, como los realizados por Nabenishi *et al.*, (2017) en ganado Negro Japonés con un coeficiente de correlación alto entre el nivel de AMH y el número de embriones transferibles ( $r=0,64$ ,  $P<0,005$ ), o el ejecutado en ganado *Bos taurus* europeo ( $r=0,430$ ,  $P<0,001$ ) por Center *et al.*, (2018).

Sin embargo, existen trabajos que describen que no existe correlación entre la concentración de AMH y el número de embriones obtenidos ( $r=0,202$ ;  $P>0,05$ ), (Sevgi *et al.*, 2019), pero son trabajos realizados en vacas Simmental.



**Tabla 6:** Valor de correlación entre la AMH vs la respuesta a la SOV, número de CL, total de estructuras, número de embriones transferibles.

	<b>Correlación</b>	<b>Sig.</b>
<i>Recuento de folículos antrales (RFA)</i>	<i>0,06</i>	<i>0,73</i>
<i>Respuesta a la superovulación (SOV)</i>	<i>0,61</i>	<i>0,000</i>
<i>N° cuerpos lúteos</i>	<i>0,46</i>	<i>0,005</i>
<i>Total estructuras</i>	<i>0,53</i>	<i>0,001</i>
<i>N° de embriones transferibles</i>	<i>0,55</i>	<i>0,001</i>

Prueba de correlación de Pearson.



## 6. CONCLUSIONES.

La muestra de sangre (plasma) tomada a donadoras en un momento desconocido de su ciclo estral, permite determinar en forma confiable el nivel de AMH, mediante la prueba de ELISA.

Las donadoras con valores  $\leq 0,05$  ng/ml son consideradas animales de bajo nivel de AMH; por lo contrario, si poseen  $\geq 0,10$  ng/ml son clasificadas como animales con alto valor de AMH.

Las donadoras con alto nivel de AMH ( $\geq 0,10$  ng/ml), proporcionan más embriones transferibles (70%) que las vacas con bajo nivel de AMH.

La hormona Antimülleriana puede ser utilizada como un marcador endócrino confiable para la selección de donadoras de embriones *in vivo*, ya que su nivel está directamente correlacionado con la respuesta a la SOV, número de CL, la cantidad y calidad de embriones transferibles obtenidos.



## **7. RECOMENDACIONES.**

Socializar las ventajas que ofrecen las biotecnologías aplicadas a la reproducción animal a los ganaderos, es de vital importancia para mejorar genéticamente los hatos productivos de nuestro país.

Establecer programas por parte de entidades públicas y privadas que incentiven el desarrollo de MOET para así acortar el intervalo generacional y aumentar eficazmente los niveles de producción, garantizando la seguridad alimentaria de la población.

Investigación constante por parte de los médicos veterinarios con el objetivo de mejorar la capacidad científica y técnica, permitiendo estandarizar el manejo y los protocolos reproductivos para los animales adaptados a nuestras condiciones.



## 8. BIBLIOGRAFÍA.

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2012). Técnicas de laboratorio usadas con frecuencia en inmunología. En *Inmunología celular y molecular* (7a ed., pp. 513–514). Elsevier.
- Adamiak, S., Mackie, K., Watt, R., Webb, R., & Sinclair, K. (2005). Impact of Nutrition on Oocyte Quality: Cumulative Effects of Body Composition and Diet Leading to Hyperinsulinemia in Cattle1. *Biology of Reproduction*, 73(5), 918–926. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.041483>
- Arega, H. (2019). Review on Growth and Development of Multiple Ovulation and Embryo Transfer Technology in Cattle. *World Scientific news*, 127(3), 191–211.
- Argudo, M. (2016). Estudio de Mercado “Sector Leche Zonal 6”. Recuperado de <https://www.scpm.gob.ec/sitio/wp-content/uploads/2019/03/Estudio-Sector-Leche-versin-Pblica-copia.pdf>
- Arthur, G., Noakes, D., & Pearson, H. (1991). *Reproducción y Obstetricia en Veterinaria* (6a ed.). Madrid: Interamericana - MacGraw Hill.
- Ayala, L., Pesántez, J., Rodas, E., Méndez, S., Soria, M., Torres, S., Vazquez, J. & Pesántez, E. (2017). Tamaño del folículo ovulatorio, cuerpo lúteo y progesterona sanguínea en vaquillas receptoras de embriones de tres razas en pastoreo en Ecuador. *Revista de Producción Animal*, 29(2), 65–72.
- Baldrighi, J., Sá Filho, M., Batista, E., Lopes, R., Visintin, J., Baruselli, P., & Assumpção, M. (2014). Anti-Mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. *Reproduction in domestic animals*, 49(6), 1015–1020. <https://doi.org/10.1111/rda.12430>
- Baracaldo, M., Martinez, M., Adamas, G., & Mapletoft, R. (2000). Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*, 53(6), 1239–1250.
- Baruselli, P., Ferreira, R. M., Sales, J., Gimenes, L., Sá Filho, M., Martins, C., Rodrigues, C., & Bó, G. (2011). Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*, 76(9), 1583–1593. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.006>
- Batista, E., Macedo, G., Sala, R., Ortolan, M., Sá Filho, M., Del Valle, T., Jesus, E., Lopes, R., Rennó, F., & Baruselli, P. (2014). Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in bos indicus (nelore) and bos taurus (holstein) heifers. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(3), 448–452. <https://doi.org/10.1111/rda.12304>



- Becaluba, F. (2007). Factores que afectan la superovulación en bovinos. Recuperado de [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)
- Betteridge, K. J. (2003). *A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques*. *Animal Reproduction Science* (Vol. 79). [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00166-0)
- Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.*, *10*(3), 344–348. Recuperado de <http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issuess/download/v10n3/p344-348> (AR628).pdf
- Bó, G., & Mapletoft, R. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, *81*(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>
- Bó, G., Tríbulo, A., & Mapletoft, J. (2011). Nuevos protocolos de superovulación para programas de transferencia de embriones en bovinos. *Spermova*, *1*(1), 26–33.
- Boeta, A., & Balcázar, A. (2018). Superovulación y transferencia de embriones. En *Fisiología reproductiva de los animales domésticos*. (pp. 322–345). México D.F.
- Burns, D., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J. L., Knight, P., & Ireland, J. J. (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. *Biology of Reproduction*, *73*(1), 54–62. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036277>
- Center, K., Dixon, D., Looney, C., & Rorie, R. (2018). Anti-Müllerian Hormone and Follicle Counts as Predictors of Superovulatory Response and Embryo Production in Beef Cattle. *Advances in Reproductive Sciences*, *06*(01), 22–33. <https://doi.org/10.4236/arsci.2018.61003>
- Dewailly, D., Andersen, C. Y., Balen, A., Broekmans, F., Dilaver, N., Fanchin, R., Griesinger, G., Kelsey, T., La Marca, A., Lambalk, C., Maso, H., Nelson, S., Visser, J., Wallace, W., & Anderson, R. A. (2014). The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Human Reproduction Update*, *20*(3), 370–385. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt062>
- Elsden, J., Hasler, J. F., & Seidel, G. (1976). Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology*, *6*(5), 523–532.
- Fleming, R., Seifer, D. B., Frattarelli, J. L., & Ruman, J. (2015). Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. *Reproductive BioMedicine Online*, *31*(4), 486–496. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.06.015>



- Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 1–3. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>
- Garzón, N., Urrego, R., & Giraldo, C. (2007). Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulación en la trasferecia de embriones bovinos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 68–77. Recuperado de <http://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/viewFile/381/1883>
- Ginther, O. (2016). The theory of follicle selection in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 57, 85–99. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.06.002>
- Gobikrushanth, M., Dutra, P., Bruinjé, T., Colazo, M., Butler, S., & Ambrose, D. (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. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.018>
- Guerreiro, B., Batista, E., Vieira, L., Sá Filho, M., Rodrigues, C., Castro Netto, A., Selveira, C., Bayeux, B., Dias, E., Monteiro, F., Accorsi, M., Lopes, R., & Baruselli, P. (2014). Plasma anti-mullerian hormone: An endocrine marker for invitro embryo production from Bos taurus and Bos indicus donors. *Domestic Animal Endocrinology*, 49(1), 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2014.07.002>
- Gutierrez, D., & Báez, G. (2014). La ultrasonografía en bovinos. *Respuestas*, 19(1), 99–106.
- Hasler, J. (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 81(1), 152–169. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010>
- IETS (International Embryo Transfer Society). (2010). *Manual of the International Embryo Transfer Society: A Procedural Guide and General Information for the Use of Embryo Transfer Technology Emphasizing Sanitary Precautions*. (D. A. Stringfellow & M. . Givens, Eds.) (4a ed.). IETS.
- IETS (International Embryo Transfer Society). (2015). 2014 Statics of embryo collection and transfer in domestic farm animalstle. Recuperado el 6 de febrero de 2019, de [https://www.iets.org/pdf/comm\\_data/december2015.pdf](https://www.iets.org/pdf/comm_data/december2015.pdf)
- INEC. (2011). *Reporte estadístico del sector agropecuario*. Recuperado de [http://www.ecuadorencifras.gob.ec/wp-content/descargas/Presentaciones/espac\\_2010.pdf](http://www.ecuadorencifras.gob.ec/wp-content/descargas/Presentaciones/espac_2010.pdf)
- Ireland, J. J., Smith, G., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Ireland, J.



- L., Mossa, F., Lonerga, P., & Evans, A. (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. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(2), 1–14. <https://doi.org/10.1071/RD10226>
- Ireland, J. J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J. L., Smith, G., Lonergan, P., & Evans, A. (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. *Human Reproduction*, 22(6), 1687–1695. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem071>
- Ireland, J. L., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G., Perez, G., Evans, A., & Ireland, J. J. (2008). Antral Follicle Count Reliably Predicts Number of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle1. *Biology of Reproduction*, 79(6), 1219–1225. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071670>
- Jaton, C., Koeck, A., Sargolzaei, M., Malchiodi, F., Price, C., Schenkel, F., & Miglior, F. (2016). Genetic analysis of superovulatory response of Holstein cows in Canada. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3612–3623. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10349>
- Jiménez, C. (2009). Superovulación: Estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en bovinos. *Rev. Med. vet. Zoot*, 56, 195–214.
- Kadokawa, H., Tameoka, N., Uchiza, M., Kimura, Y., & Yonai, M. (2008). Short Communication: A Field Study on the Relationship Between Body Condition and Embryo Production in Superovulated Holstein Yearling Heifers. *Journal of Dairy Science*, 91(3), 1087–1091. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0642>
- Kafi, M., & McGowan, M. (1997). Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science*, 48(2–4), 137–157. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(97\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(97)00033-X)
- Kevenaar, M., Meerasahib, M., Kramer, P., Van De Lang-Born, B., De Jong, F., Groome, N., Themmen, A., & Visser, J. (2006). Serum anti-Müllerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology*, 147(7), 3228–3234. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1588>
- Koyama, K., Koyama, T., & Sugimoto, M. (2018). Repeatability of antral follicle count according parity in dairy cows. *Journal of Reproduction and Development*, 64(6), 535–539. <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-062>
- Lamb, G. C., Mercadante, V. R. G., & Fontes, P. L. P. (2016). *Donor and recipient management to optimize embryo technology success. Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle.*



- Lonergan, P., & Boland, M. (2011). Multiple ovulation and embryo transfer. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2, 623–630. <https://doi.org/doi:10.1016/b978-0-12-374407-4.00201-6>
- Mapletoft, R., Bennett, K., & Adamas, G. (2002). Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod.Nutr.Dev*, 42, 601–611.
- Mapletoft, R., & Bó, G. (2012). The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod Fertil Dev*, 24, 278–283.
- Medrano, J., Evangelista, S., Sandoval, R., Ruiz, L., Delgado, C., & A., S. (2014). Aplicación de la técnica no quirúrgica de transferencia de embriones bovinos en un establo de la cuenca lechera de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*, 25(1), 95–102.
- Monniaux, D., Drouilhet, L., Rico, C., Estienne, A., Jarrier, P., Touzé, J., Sapa, J., Phocas, F., Dupont, J., Dalbiés-Tran, R., & Fabre, S. (2013). Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(1), 1–16. <https://doi.org/10.1071/RD12270>
- Monniaux, D., Rico, C., Larroque, H., Dalbiès-Tran, R., Médigue, C., Clément, F., & Fabre, S. (2010). Anti-Müllerian hormone, an endocrine predictor of the response to ovarian stimulation in the bovine species. *Gynecologie Obstetrique et Fertilité*, 38(7–8), 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2010.05.009>
- Moore, S., & Hasler, J. (2017). A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10314–10331. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13138>
- Morotti, F., Barreiros, T., Machado, F., González, S., Marinho, L., & Seneda, M. (2015). Is the number of antral follicles an interesting selection criterium for fertility in cattle? *Anim. Reprod*, 12(3), 479–486. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020420>
- Morotti, F., Zangirolamo, A., Silva, C., Silva, N., Oliveira, C., & Seneda, M. (2017). Antral follicle count in cattle: advantages, challenges, and controversy. *Animal Reproduction*, 14(3), 514–520. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar994>
- Mossa, F., Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D., Weber-Nielsen, M., Evans, A., & Ireland, J. J. (2017). Anti-Müllerian Hormone (AMH) and fertility management in agricultural species. *Reproduction*, 154(1), R1–R11. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0104>
- Mossa, F., Smith, G., Evans, A., Carter, F., Lonergan, P., Butler, S., Ireland, J., Walsh, S., & Berry, D. (2012). Low numbers of ovarian follicles  $\geq 3$ mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95(5), 2355–2361. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4325>



- Nabenishi, H., Kitahara, G., Takagi, S., Yamazaki, A., & Osawa, T. (2017). Domestic Animal Endocrinology 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. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2017.01.002>
- Ortega, V. ., Dután, J. ., Ayala, L. ., Rodas, E. ., Nieto, P. ., Vázquez, J. ., Pesántez, J., Guevara, G., Murillo, Y., Serpa, G., Calle, G., & Samaniego, J. . (2017). Caracterización productiva de las ganaderías en los cantones occidentales de la provincia del Azuay. *Maskana*, 8(October), 145–147. Recuperado de <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1510/1195>
- Palma, A. (2001). Recolección de los embriones bovinos. En *Biotechnología de la reproducción* (pp. 109–124). Mar de plata.
- Palma, A. (2008). Bioteconología de la Reproducción, ciencia, tecnología y sociedad. En *Biotechnología de la reproducción* (segunda). Mar de plata.
- Perry, G., & Cushman, R. (2016). *Use of ultrasonography to make reproductive management decisions*. *Professional Animal Scientist* (Vol. 32). <https://doi.org/10.15232/pas.2015-01446>
- Phillips, P., & Jahnke, M. (2016). Embryo Transfer (Techniques, Donors, and Recipients). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 32(2), 365–385. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.008>
- Ribeiro, E., Bisinotto, R., Lima, F., Greco, L., Morrison, A., Kumar, A., Thatcher, W., & Santos, J. (2014). Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6888–6900. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7908>
- Rico, C., Bontoux, M., Clemente, N., Dupont, M., Briant, E., Monniaux, D., Beckers, J., Medigue, C., Clement, F., Fabre, S., Touze, J., & Remy, B. (2009). Anti-Mullerian Hormone Is an Endocrine Marker of Ovarian Gonadotropin-Responsive Follicles and Can Help to Predict Superovulatory Responses in the Cow. *Biology of Reproduction*, 80(1), 50–59. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072157>
- Rico, C., Drouilhet, L., Salvetti, P., Dalbès-Tran, R., Jarrier, P., Touze, J., Pillet, E., Ponsart, C., Fabre, S., & Monniaux, D. (2012). Determination of anti-Müllerian 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(7), 932–944. <https://doi.org/10.1071/RD11290>
- Sanderson, N., Lawrence, S., Juengel, J., Martinez, M., & Quirke, L. (2015). Association between antral follicle count and reproductive measures in New



- Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. *Theriogenology*, 85(3), 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.026>
- Sartori, R., Monteiro, P., & Wiltbank, M. (2016). Endocrine and metabolic differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* cows and implications for reproductive management. *Animal Reproduction*, 13(3), 168–181. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar868>
- Seidel, G., & Moore, S. (1991). Training manual for embryo transfer in cattle. Recuperado el 18 de febrero de 2019, de <http://www.fao.org/3/T0117E/T0117E00.htm#TOC>
- Sevgi, R., Erdem, H., Karaşahin, T., Yılmaz, M. A., Satılmış, M., Okuroğlu, A., Ünal, I., Dursun, Ş., Alkan, H., Satılmış, F., & Güler, M. (2019). Determination of the relationship between serum anti-Müllerian hormone level and superovulatory response in Simmental cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(10), 1322–1329. <https://doi.org/10.1111/rda.13506>
- Silva-Santos, K., Santos, G., Seneda, M., Lima, D., Morotti, F., Koetz Júnior, C., oliveira, R., Marcantonio, T., Urbano, M., & Siloto, L. (2014). Antral Follicle Populations and Embryo Production - In Vitro and In Vivo - of *Bos indicus-taurus* Donors from Weaning to Yearling Ages. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(2), 228–232. <https://doi.org/10.1111/rda.12255>
- Singh, J., Domínguez, M., Jaiswal, R., & Adams, G. (2004). A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology*, 62(1–2), 227–243. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.09.020>
- Soria, M., Soria, C., Argudo, D., Serpa, G., Méndez, S., Torres, C., & Guevara, G. (2017). Superovulación con sincronización de la onda folicular y con celo natural en vacas Holstein. *Rev. prod. anim*, 29(1), 41–44.
- Souza, A., Carvalho, P., Rozner, A., Vieira, L., Hackbart, K., Bender, R., & Dresch, A. (2015). Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 1–10. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8182>
- Starbuck, M. (2005). *Factors affecting reproductive efficiency of cattle. Graduate Theses, Dissertations, and Problem Reports*. West Virginia University.
- Stringfellow, D., & Givens, M. (2010). *Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS)* (4a ed.). Champaign: IL:IETS.
- Torres, L. (2012). *Comparative study on the potential reproductive differences of ewe lambs with diverse antral follicle count at an early prepubertal age*. Università Degli Studi Di Sassari.



- Tríbulo, A. (2015). *Superovulación de vacas donantes de embriones utilizando una o dos aplicaciones de hormona foliculo estimulante*. Universidad Nacional de Córdoba. Recuperado de [https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/1815/Tríbulo%2C Andrés - Superovulación de vacas donantes de embriones utilizando una o dos aplicaciones....pdf?sequence=6&isAllowed=y](https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/1815/Tríbulo%2C%20Andr%C3%A9s%20-%20Superovulaci%C3%B3n%20de%20vacas%20donantes%20de%20embriones%20utilizando%20una%20o%20dos%20aplicaciones....pdf?sequence=6&isAllowed=y)
- Tríbulo, H., & Bó, G. (2009). Biotecnologías Reproductivas. En *Reproducción de Animales Domésticos* (tercera, pp. 543–569). México D.F: Limusa.
- Viana, J. (2018). 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more in vitro-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. *Embryo Transfer News*, 36(December 2018), 17. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/330912447\\_2017\\_Statistics\\_of\\_embryo\\_production\\_and\\_transfer\\_in\\_domestic\\_farm\\_animals\\_Is\\_it\\_a\\_turning\\_point\\_In\\_2017\\_more\\_in\\_vitro-produced\\_than\\_in\\_vivo-derived\\_embryos\\_were\\_transferred\\_worldwide](https://www.researchgate.net/publication/330912447_2017_Statistics_of_embryo_production_and_transfer_in_domestic_farm_animals_Is_it_a_turning_point_In_2017_more_in_vitro-produced_than_in_vivo-derived_embryos_were_transferred_worldwide)
- Zylbersztein, C. (2008). Hormona anti Mülleriana. Su influencia en la salud reproductiva de la mujer. *Revista de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva*, 1(2), 13–28.



## 9. ANEXOS.

### Anexo 1: Ficha de selección de donadoras.

 <p style="text-align: center;"><b>UNIVERSIDAD DE CUENCA</b> <b>FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS</b> <b>CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y</b> <b>ZOOTECNIA</b></p> 	
<p><b>Tesis de pregrado:</b> <i>La Hormona Antimülleriana como un predictor endocrino para estimar la producción de embriones transferibles in vivo.</i></p>	
<p><b>1. Datos generales:</b></p>	
<b>Ganadería:</b>	<b>Fecha:</b>
<b>Localización</b>	
<b>Propietario</b>	
<b>Nombre de donante / Número</b>	
<b>Raza:</b>	
<b>Edad:</b>	
<b>Peso:</b>	
<b>Estado productivo:</b>	
<b>Producción prom:</b>	
<p><b>2. Anamnesis:</b></p>	
<b>Número de partos:</b>	
<b>Fecha de último parto</b>	
<b>Ciclicidad</b>	
<b>Problemas Reproductivos</b>	
<b>Prueba de Enhebrado</b>	
<b>¿Para la última gestación cuántos servicios recibió?</b>	
<b>¿Ha sido repetidora?</b>	
<b>Fecha de último celo</b>	
<b>Fecha de último servicio</b>	
<b>Observaciones:</b>	



3. Historial Clínico	
Tipo de parto:	
Última enfermedad presentada:	
Fecha de último tratamiento:	
Fármacos aplicados:	
Desparasitación:	
Observaciones:	

4. Revisión clínica:	
Condición corporal (1 – 5)	

5. Chequeo ginecológico:					
Ubicación de útero					
Cuerno derecho:					
Cuerno izquierdo:					
Ovario derecho			Ovario izquierdo		
Estructura	Nº	Tamaño	Estructura	Nº	Tamaño
Cuerpo lúteo			Cuerpo lúteo		
Observaciones:			Observaciones:		
6. Prueba de enhebrado:					

7. Concentración sérica de AMH:	



8. Respuesta SOV:			
Ovario Derecho		Ovario Izquierdo	
R.F.A	Tamaño Prom:	R.F.A	Tamaño Prom:
Observaciones:		Observaciones:	

9. Valoración de la ovulación:							
Ovario Derecho				Ovario Izquierdo			
Cuerpo Luteo	Tamaño Prom:	Foliculo sin ovular	Tamaño Prom:	Cuerpo Luteo	Tamaño Prom:	Foliculo sin ovular	Tamaño Prom:
Observaciones:				Observaciones:			

10. Colección de embriones:				
Número total de estructuras:		7		
Etapas de desarrollo:	Etapas		Número	Calidad
	1	UFO (1 célula)		
	2	2 – 12 células (degenerado)		
	3	Mórula temprana		
	4	Mórula		
	5	Blastocisto temprano		
	6	Blastocisto		
	7	Blastocisto expandido		
8	Eclosionado			
Observaciones:				
Número de estructuras transferibles:				



Número de estructuras congelables:			
Calidad del embrión:		<b>Calidad</b>	<b>Número</b>
	1	Excelente	
	2	Bueno	
	3	Regular	
	4	Malo	

**Anexo 2:** Protocolo de SOV.**PROTOCOLO DE SUPEROVULACIÓN DONANTES****GRANJA SR. PABLO MOLINA****INICIO: 27 DE OCTUBRE DEL 2019****1 Donadoras**

Día	Fecha	Día	Mañana (06h00)	Tarde (18h00)
Domingo	27/10/2019	0	CIDR+BE (2mg=2cc)+P4 (50mg=2cc)	
Lunes	28/10/2019	1		
Martes	29/10/2019	2		
Miércoles	30/10/2019	3		
Jueves	31/10/2019	4		FSH (60mg=3cc)
Viernes	01/11/2019	5	FSH (60mg=3cc)	FSH (40mg=2cc)
Sábado	02/11/2019	6	FSH (40mg=2cc)	FSH (30mg=1,5cc)+PG (25mg=5cc)
Domingo	03/11/2019	7	FSH (30mg=1,5cc)+PG (25mg=5cc)	FSH (20mg=1cc)+Retiro del CIDR+Parche
Lunes	04/11/2019	8	FSH (20mg=1cc)	Observar celo
Martes	05/11/2019	9	GnRH (0,25mg=2,5cc)+IA	IA
Martes	12/11/2019	16	Colecta	

**Anexo 3:** Plantilla para el análisis AMH.

No de Examen:	1											
Responsable:	Jeffersson Bermeo & Andrés Jácome											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Estándar 1 (20 ng/ml)	Estándar 5 (1,25 ng/ml)	Control 1	A1	B4	B1	A12	A45	B17	B21	A24	B72
<b>B</b>	Estándar 1 (20 ng/ml)	Estándar 5 (1,25 ng/ml)	A4	A2	B8	B2	A17	A50	B18	B30	A25	B73
<b>C</b>	Estándar 2 (10 ng/ml)	Estándar 6 (0,625 ng/ml)	A5	A3	B9	B5	A18	A51	B22	B31	A26	B74
<b>D</b>	Estándar 2 (10 ng/ml)	Estándar 6 (0,625 ng/ml)	A6	A13	B12	B6	A19	A63	B23	B39	A28	B76
<b>E</b>	Estándar 3 (5 ng/ml)	Estándar 7 (0,312 ng/ml)	A7	A15	B13	B7	A20	A71	B24	B52	A29	A33
<b>F</b>	Estándar 3 (5 ng/ml)	Estándar 7 (0,312 ng/ml)	A8	A16	B14	B10	A21	A72	B25	B53	A30	A34
<b>G</b>	Estándar 4 (2,5 ng/ml)	Estándar 8 (0 ng/ml)	A9	A27	B15	B19	A22	A73	B26	B54	A31	A35
<b>H</b>	Estándar 4 (2,5 ng/ml)	Estándar 8 (0 ng/ml)	A10	A41	B16	B20	A23	A74	B27	B55	A32	Control 2

**Anexo 4:** Fotografías de la investigación.

- Fotografías de algunas donadoras.



Donadora: Laptori.  
Hacienda: Pablo Molina.



Donadora: Carlotita.  
Hacienda: Adrián Aguilar.



Donadora: Julia.  
Hacienda: Adrián Aguilar.



Donadoras: Andrea y Manzanilla.  
Hacienda: "Moya".



Donadora: 369.  
Hacienda: "Irquis".



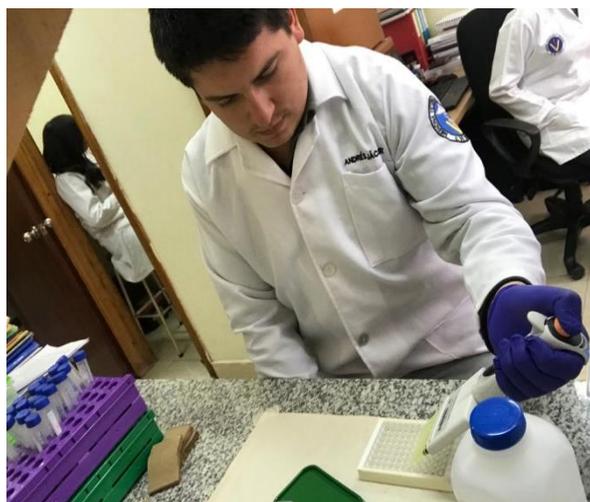
Donadora: 459.  
Hacienda: "Nero".



Aplicación de FSH.  
Hacienda: Rosa Yunda.



Detección de celo en las donadoras.  
Hacienda: "Moya".



Análisis de AMH.  
Laboratorio de Biología Molecular.  
Facultad de Ciencias Agropecuarias.  
Universidad de Cuenca.



I.A donadoras.  
Hacienda: "Moya".



I.A donadoras.  
Hacienda: "El Suco".



Ultrasonografía.  
Hacienda: "El Suco".



Ultrasonografía.  
Hacienda: Pablo Molina.



Valoración de la respuesta de la SOV.



Valoración del número de C.L.



Materiales necesarios para el lavado de



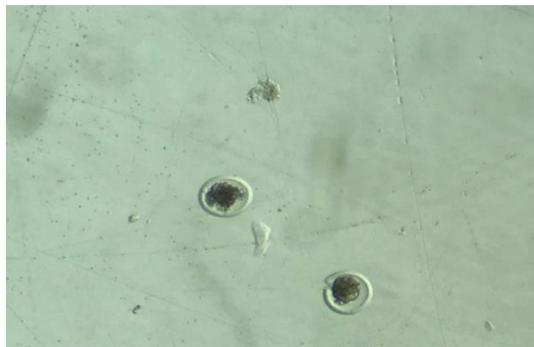
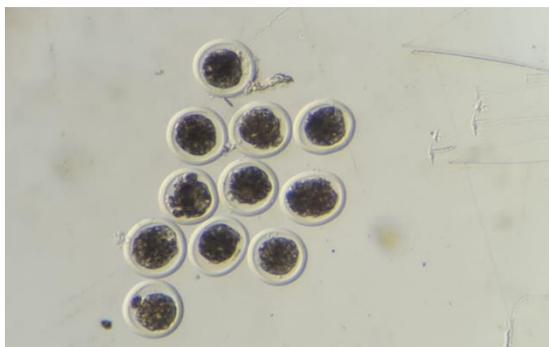
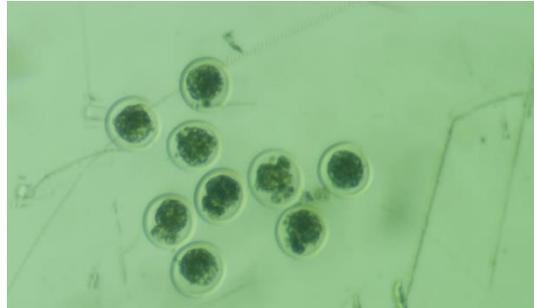
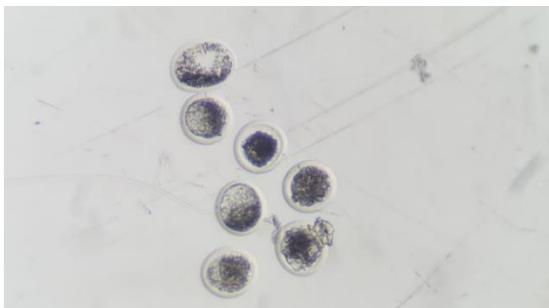
Aplicación de anestesia epidural en las donadoras.



Lavado de embriones.  
Hacienda: "Sustag".



Lavado de embriones.  
Hacienda: "El suco".



Recolección de embriones en diferentes estados de desarrollo y calidad.