



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**“Hormona antimulleriana como indicador para seleccionar donadoras de ovocitos, que mejoren los resultados de la producción de embriones *in vitro*”**

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

**Autoras:**

Miriam Abigail Reinoso Peralta

CI: 0302671847

Correo electrónico: [mirianreinoso1997@hotmail.es](mailto:mirianreinoso1997@hotmail.es)

Diana Isabel Sharup Guanuchi

CI: 1401066087

Correo electrónico: [dianys090@gmail.com](mailto:dianys090@gmail.com)

**Director:**

Dr. Luis Eduardo Ayala Guanga, Ph.D

CI:0102635463

**Cuenca, Ecuador**

01-junio-2021



## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar si los niveles plasmáticos de hormona antimulleriana (AMH) guardan relación con la cantidad y calidad de ovocitos recuperados por OPU. Para ello se emplearon 61 vaconas Holstein mestizas criadas en ganaderías ubicadas sobre los 2.500 msnm, de la provincia del Azuay. Este estudio contempló la realización de dos experimentos (E1, E2), el primer E1 se desarrolló con 61 vaconas, las cuales fueron sometidas a un protocolo estándar de sincronización con el fin de tener homogeneidad del ciclo estral: día 0=dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (DIV 1.3 g) + 2mg BE (IM), día 7=retiro del (DIV 1.3 g) + 25 mg de prostaglandina (IM) + parches adhesivos detectores de celo, día 8=1mg de BE. La aplicación de este protocolo permitió tomar una muestra de sangre (102 horas pos-retiro del dispositivo intravaginal), determinando así los niveles de la AMH mediante ELISA y su relación con el recuento de folículos antrales (RFA). El segundo E2 se realizó para establecer valores de corte, para clasificar vaconas con alto (n=5) y bajo (n=5) nivel de AMH, valoradas en el E1; a los animales del E2 se les realizó tres sesiones de (aspiración folicular) OPU con un intervalo de 4 días. En el E1, se determinó que los niveles plasmáticos de la AMH tenían relación significativa con el número total de folículos  $\geq 4$ mm de tamaño ( $r= 0.89$ ;  $p<0,0001$ ). Se observó que el grupo de vaconas con altos niveles plasmáticos de AMH, tenían mayor RFA respecto al grupo de bajo nivel de AMH ( $23,3 \pm 0,71$  vs.  $11,8 \pm 0,43$  ng/ml;  $P<0,05$ ). Las vaconas del E2, que poseían un alto nivel plasmático de AMH se determinó un promedio de  $19,06 \pm 0,76$  folículos comparado con el grupo de bajo nivel de AMH  $11,15 \pm 0,83$ , con diferencia estadística ( $P<0,001$ ), y el porcentaje de recuperación de ovocitos fue mayor en el grupo de alto que en el bajo nivel de AMH ( $8,69 \pm 0,49$  vs.  $4,15 \pm 0,32$ ;  $P<0,001$ ). Finalmente, al clasificar el total de COC's obtenidos, se determinó que los ovocitos aptos fueron el doble en el grupo de alta concentración de AMH en comparación con el de bajo ( $6,69 \pm 0,49$  vs.  $3,00 \pm 0,38$ ;  $P<0,05$ ).

**Palabras clave:** Hormona antimulleriana. Folículos. Bovinos. Elisa.



## ABSTRACT

The objective of the present study was to determine whether plasma levels of antimullerian hormone (AMH) are related to the quantity and quality of oocytes recovered by OPU. For which crossbreed Holstein heifers were used raised in herds located over 2,500 meters above sea level, in the province of Azuay. This study contemplated the performance of two experiments (E1, E2), the first E1 was developed with 61 heifers, which were subjected to a standard synchronization protocol in order to have homogeneity of the estrous cycle: day 0 = intravaginal progesterone release device (IVD 1.3 g) + 2mg BE (IM), day 7 = withdrawal of (DIV 1.3 g) + 25 mg of prostaglandin (IM) + adhesive heat detection patches, day 8 = 1mg BE. The application of this protocol allowed taking a blood sample ((102 hours post removal of the intravaginal device), thus determining the levels of AMH by ELISA and its relationship with the antral follicle count (AFR). The second E2 was carried out to establish cut off values, to classify heifers with high (n = 5) and low (n = 5) levels of AMH, valued at E1; The E2 animals underwent three sessions of OPU (follicular aspiration) with an interval of 4 days. In E1, plasma levels of AMH were found to be significantly related to the total number of follicles  $\geq 4$ mm in size ( $r= 0,89$ ;  $p<0,0001$ ). It was observed that the group of heifers with high plasma levels of AMH had higher RFA compared to the group with low level of AMH (23,3 0,71 vs. 11,8 0,43 ng/ml;  $P<0.05$ ). The E2 heifers, which had a high plasma level of AMH, an average of  $19.06 \pm 0.76$  follicles was determined compared to the group with a low level of AMH  $11.15 \pm 0.83$ , with statistical difference ( $P <0,001$ ), and the percentage of oocyte recovery was higher in the high group than in the low AMH group ( $8,69 \pm 0,49$  vs.  $4,15 \pm 0,32$ ;  $P <0.001$ ). Finally, when classifying the total COC's obtained, it was determined that the suitable oocytes were twice as high in the group with high AMH concentration compared with the low one ( $6,69 \pm 0,49$  vs.  $3,00 \pm 0,38$ ;  $P<0.05$ ).

**Keywords:** Antimullerian hormone. Follicles. Cattle. Elisa.



## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
ÍNDICE DE FIGURAS .....	5
ÍNDICE DE TABLAS .....	6
ÍNDICE DE ANEXOS .....	7
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA .....	15
1. INTRODUCCIÓN .....	16
2. OBJETIVOS .....	19
2.1. Objetivo General .....	19
2.2. Objetivos específicos .....	19
3. REVISIÓN DE LITERATURA .....	20
3.1. Concepto de <i>Ovum Pick Up</i> (OPU) .....	20
3.1.1. Protocolos de sincronización OPU .....	21
3.1.2. Técnica de aspiración folicular <i>Ovum pick up</i> (OPU) .....	24
3.2. Hormona Antimulleriana (AMH) .....	27
3.2.1. Funciones de la AMH específicas del ovario .....	29
3.2.2. Técnica de diagnóstico para la determinación de AMH (ELISA) .....	30
3.3. Producción de embriones <i>in vitro</i> (PIV) .....	31
3.4. Protocolo para producción de embriones <i>in vitro</i> (PIV) .....	32
3.4.1. Métodos empleados para la recolección de ovocitos .....	33
3.4.2. Sistema de producción <i>in vitro</i> de embriones .....	34
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
4.1. Materiales .....	38
4.1.1. Materiales Biológicos .....	38
4.1.2. Materiales Químicos .....	38



4.1.3.	Materiales Físicos .....	38
4.1.4.	Materiales de Laboratorio.....	39
4.2.	Métodos .....	40
4.2.1.	Área de estudio .....	40
4.2.2.	Ubicación política-geográfica.....	40
4.2.3.	Unidades experimentales .....	40
4.2.4.	Diseño experimental .....	41
4.2.5.	Análisis estadístico: .....	47
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	49
5.1.	Concentración plasmática media de hormona Antimulleriana (AMH) .....	49
5.2.	Recuento de folículos antrales (RFA).....	50
5.3.	Relación entre el recuento de folículos antrales y los niveles plasmáticos de antimulleriana .....	52
	Relación entre la cantidad y calidad de COC´s obtenidos por OPU .....	56
6.	CONCLUSIONES.....	60
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	61
8.	ANEXOS .....	71



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Sistema de ovum pick up (OPU) .....	26
<b>Figura 2:</b> Clasificación morfológica de los COC's.....	27
<b>Figura 3:</b> La AMH es secretada por folículos pre-antrales (líneas discontinuas) y antrales (líneas continuas). Se ha postulado que inhibe el reclutamiento de folículos primordiales (a. reclutamiento inicial) y el crecimiento de folículos FSH-dependientes (b. reclutamiento cíclico).....	30
<b>Figura 4:</b> Ubicación del área de estudio (Azuay).....	40
<b>Figura 5:</b> Esquema del protocolo de sincronización de la onda de crecimiento folicular.....	43
<b>Figura 6:</b> Protocolo de sesiones de OPU en cada uno de los grupos experimentales (G1; G2).....	46
<b>Figura 7:</b> Clasificación morfológica de los COC's. ....	47
<b>Figura 8:</b> Representación de la asociación entre los niveles plasmáticos de la hormona Antimulleriana (AMH) con el recuento de folículos antrales (RFA). Se muestra una línea de regresión lineal simple con su ecuación para facilitar la interpretación de los datos.....	54
<b>Figura 9:</b> Valores medio y error estándar de la concentración plasmática de Hormona Antimulleriana en grupos de baja (blanco), media (gris) y alta (punteada). Diferentes literales indican diferencia estadística entre grupos ( $P<0,01$ ).....	55
<b>Figura 10:</b> Valores medios y error estándar del recuento de folículos antrales (RFA), en los grupos de baja (blanco), media (gris) y alta (punteada) concentración de AMH.. Diferentes literales indican diferencia estadística entre grupos ( $P<0,01$ ) .....	56



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Valores descriptivos de los niveles de hormona antimulleriana (AMH) y el recuento de folículos antrales (FRA) en vaconas Holstein mestizas.....	51
<b>Tabla 2:</b> Respuesta ovárica de vaconas Holstein mestizas sometidas a la técnica de OPU sin estimulación ovárica (media± desviación estandar). .....	57
<b>Tabla 3:</b> valores medios y error estándar de los folículos aspirados y ovocitos recuperados en cada sesión mediante OPU, en los grupos de baja y alta concentración de AMH. ....	58
<b>Tabla 4:</b> Valores medios y error estándar del tipo de COC´ obtenidos en cada sesión mediante OPU, en los grupos de baja (n=5) y alta (n=5) concentración de AMH.....	59



## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Materiales y herramientas para protocolo de sincronización .....	71
<b>Anexo 2:</b> Plantilla de registro del recuento de folicular.....	73
<b>Anexo 3:</b> Materiales y equipos utilizados para el análisis de la AMH .....	74
<b>Anexo 4:</b> Procedimiento de las sesiones de OPU .....	78
<b>Anexo 5:</b> Valoración de los ovocitos recuperados mediante OPU .....	79
<b>Anexo 6:</b> Plantilla para el registro de la cantidad y calidad de folículos observados y COC's recuperados en cada sesión de OPU .....	81





Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio  
Institucional

---

Miriam Abigail Reinoso Peralta, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Hormona antimülleriana como indicador para seleccionar donadoras de ovocitos, que mejoren los resultados de la producción de embriones *in vitro*", 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.

Así mismo, autorizo a la Universidad de Cuenca, para que realice a publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional, de conformidad a lo dispuesto en Art.144 de la Ley Orgánica de Educación.

Cuenca, 01 de junio de 2021

---

Miriam Abigail Reinoso Peralta

C.I: 0302671847



### Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Miriam Abigail Reinoso Peralta, autora del trabajo de titulación "Hormona antimulleriana como indicador para seleccionar donadoras de ovocitos, que mejoren los resultados de la producción de embriones *in vitro*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 01 de junio de 2021

---

Miriam Abigail Reinoso Peralta

C.I: 0302671847



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio  
Institucional

---

Diana Isabel Sharup Guanuchi, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Hormona antimulleriana como indicador para seleccionar donadoras de ovocitos, que mejoren los resultados de la producción de embriones *in vitro*", 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.

Así mismo, autorizo a la Universidad de Cuenca, para que realice a publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional, de conformidad a lo dispuesto en Art.144 de la Ley Orgánica de Educación.

Cuenca, 01 de junio de 2021

---

Diana Isabel Sharup Guanuchi

C.I: 1401066087



Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Diana Isabel Sharup Guanuchi, autora del trabajo de titulación "Hormona antimulleriana como indicador para seleccionar donadoras de ovocitos, que mejoren los resultados de la producción de embriones *in vitro*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 01 de junio de 2021

---

Diana Isabel Sharup Guanuchi

C.I: 1401066087



## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, que me ha regalado la vida para estar aquí en donde estoy, culminado una etapa más en mi vida, llena de conocimientos y valores que cada día permiten mi superación personal y profesional.

A Fernando una de las personas más especiales en mi vida, gracias por el amor y apoyo incondicional. La fuerza que todo ser necesita para no sentirse solo y saber que para alguien tu felicidad es la suya también.

A mi director de tesis, Dr. Luis Ayala que me permitió formar parte de su grupo de trabajo, gracias infinitas por el tiempo y dedicación brindada durante el tiempo que trabajamos juntos.

A los Doctores José Luis Pesantez y Xavier Samaniego, por el apoyo en las prácticas de campo que permitieron valorar los conocimientos y experiencia de unos excelentes profesionales.

A Diana, mi compañera de tesis gracias por haber aceptado formar parte del grupo de proyecto de tesis que luchamos día con día para lograrlo y hoy verlo realizado. Gracias por la confianza y dedicación para terminar nuestro trabajo.

**Miriam Reinoso**



## AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por su compañía, por haberme dado fuerza y valor a lo largo de mi carrera, siendo mi apoyo en los momentos más difíciles y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante en mi formación personal.

A mi madre Digna Guanuchi Alvarado por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias por todo su esfuerzo, su apoyo y por la confianza que depositó en mí. Gracias porque, aunque lejos, ha estado a mi lado en los momentos más importantes y difíciles de mi vida.

A mis hermanos que siempre confiaron en mí. En especial a mi hermano Eddy, gracias por su apoyo incondicional durante mi formación académica y por ser parte fundamental en el logro de esta meta.

A Carlos Luis, por ser una persona muy importante en mi vida, por estar ahí en las buenas y en las malas, sobre todo por su paciencia, comprensión y amor incondicional.

A mi director de tesis al Dr. Luis Ayala por su esfuerzo, quien, con su experiencia, su paciencia y dedicación nos ha guiado para la obtención de nuestro título profesional, gracias por su tiempo, apoyo y amistad.

A los Doctores José Luis Pesantez y Xavier Samaniego por compartir su tiempo, sus conocimientos y por el apoyo que nos brindaron para culminar con nuestra tesis de pregrado. Al Dr. Antonio Vallecillo por su colaboración y acogida en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

A mi compañera de tesis Miriam, por confiar en mi persona, por la paciencia y amistad, gracias por compartir este logro. A Fernando Padilla, por su amistad y por el apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

**Diana Sharup**



## **DEDICATORIA**

A Martin Josué, una de las razones más importantes en mi vida, el ser que cada día hace que me despierte con ganas de crecer y trabajar por la causa más bella dedicarnos y hacer lo que nos apasiona, Medicina Veterinaria.

A mi familia, de manera especial a Clarita la persona que siempre confió en mí, que pesar de todas las adversidades supimos aprovechar cada momento y valorar su esfuerzo para que cumpliera mis sueños. La felicidad de su corazón es la felicidad de mi alma siempre los llevaré en mi mente y en mi corazón.

**Miriam Reinoso**

Todo este esfuerzo se la dedico a mi madre querida Digna Guanuchi, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional. Por ayudarme en las buenas y en las malas, y guiarme por el camino del bien con buenos valores, además de haberme dado la vida, siempre confió en mí y nunca me abandonó. Para ti mami, por demostrarme que con mucho sacrificio y perseverancia se puede lograr muchas cosas.

Te quiero mamita.

**Diana Sharup**



## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

<b>AMH:</b>	Hormona Antimulleriana
<b>AFP:</b>	Población folicular ovárica
<b>BE:</b>	Benzoato de estradiol
<b>COC's:</b>	Complejo cúmulos ovocito
<b>DIV:</b>	Dispositivo Intravaginal
<b>E2:</b>	Estradiol
<b>eCG:</b>	Gonadotropina Coriónica Equina
<b>FSH:</b>	Hormona Folículo Estimulante
<b>FIV:</b>	Fecundación <i>in vitro</i> de embriones
<b>GnRH:</b>	Hormona liberadora de Gonadotropinas
<b>g:</b>	Gramos
<b>IM:</b>	Intramuscular
<b>kg:</b>	Kilogramo
<b>LH:</b>	Hormona Luteinizante
<b>MIV:</b>	Maduración <i>in vitro</i> de embriones
<b>mg:</b>	Miligramo
<b>ml:</b>	Mililitro
<b>mm:</b>	Milímetro
<b>mmHg:</b>	Milímetro de Mercurio
<b>MHz:</b>	Mega Herz
<b>nm:</b>	Nanómetro
<b>ng:</b>	Nanogramos
<b>OPU:</b>	Ovum pick-up
<b>PBS:</b>	Solución Buffer Fosfato
<b>P4:</b>	Progesterona
<b>PIV:</b>	Producción <i>in vitro</i> de embriones
<b>rpm:</b>	Revoluciones por minuto
<b>TE:</b>	Transferencia de Embriones
<b>UI:</b>	Unidades Internacionales
<b>µl:</b>	Microlitro





## 1. INTRODUCCIÓN

La aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido (*Ovum Pick-up*, por sus siglas en inglés), es una técnica descrita inicialmente por Pieterse *et al.*, (1988), que se ha y se sigue usando hasta la actualidad como una alternativa para obtener ovocitos de vacas y novillas *in vivo*, además esta técnica se la usa de manera combinada con la producción de embriones *in vitro* (PIV, por sus siglas en inglés), estas dos metodologías son consideradas como una alternativa para la propagación del material genético y con ello ha permitido mejorar la genética de las ganaderías a nivel mundial, (Bó & Mapletoft, 2014). Para optimizar esta biotécnica se han estudiado factores biológicos, mecánicos y técnicos que afectan de una u otra manera el desarrollo de esta metodología (Baruselli *et al.*, 2016), como la estimulación hormonal (Chaubal *et al.*, 2006), el momento de la aspiración folicular después de la administración hormonal (Ayala *et al.*, 2020), la raza de la donante (Ruiz *et al.*, 2013), el diámetro, longitud de la aguja y la presión de aspiración (Argudo *et al.*, 2018).

Si bien todos estos factores han contribuido al desarrollo de esta biotecnología (Bols *et al.*, 2004), los resultados obtenidos no siempre son los esperados, posiblemente se deba a las características fisiológicas individuales de cada donante (Ireland *et al.*, 2007), tales como el recuento de folículos antrales (RFA) presentes en los ovarios al momento de la OPU (Ireland *et al.*, 2011), ya que un número alto de folículos antrales se asocia de manera positiva con un mayor número de ovocitos recuperados por OPU (Vernunft *et al.*, 2015), con buena competencia ovocitaria que permite obtener mayor número de embriones transferibles (Guerreiro *et al.*, 2014). Por lo tanto, identificar de manera temprana dentro del rebaño a un grupo de hembras con alto RFA podría mejorar los resultados hasta ahora obtenidos en OPU-PIV (Batista *et al.*, 2014). Es así que, en la



actualidad la ecografía transrectal es utilizada para identificar y seleccionar donadoras con alta RFA (Singh *et al.*, 2004). Sin embargo, es una metodología que requiere personal capacitado, la implementación de equipos costosos e instalaciones adecuadas que faciliten la valoración cuidadosa de las imágenes obtenidas (Perry & Cushman, 2016); además, es necesario realizar varios escaneos ecográficos de toda la superficie del ovario durante cada ciclo estral para determinar con exactitud el RFA, ya que el número de folículos presentes en los ovarios está sujeto a variaciones de tipo cíclico asociado con las ondas de crecimiento folicular, lo cual complica aún más la interpretación de las imágenes (Ginther, 2016).

Por lo tanto, una alternativa a la técnica de ultrasonografía que ha generado gran expectativa es la cuantificación plasmática de la hormona Antimülleriana (AMH), una glicoproteína de 140 kDa que pertenece a la familia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), esta hormona es producida específicamente por las células de la granulosa de folículos pequeños en crecimiento (< a 5mm) (Monniaux *et al.*, 2010), que ha decir de (Sakaguchi *et al.*, 2019), mantiene relación directa con el RFA tanto en *Bos indicus* (Silva *et al.*, 2014), así como en *Bos taurus* (Souza *et al.*, 2015), ambas razas mantenidas en condiciones de manejo intensivo en el trópico bajo. Asimismo, varios estudios han descrito que los niveles de AMH pueden utilizarse como biomarcador endócrino para predecir la respuesta ovulatoria en vacas de aptitud lechera (Rico *et al.*, 2012), en vaquillas criadas y adaptadas a países que presentan cuatro estaciones (Nabenishi *et al.*, 2017) y en el trópico bajo en condiciones climáticas de humedad (Batista *et al.*, 2014) y secos (Abdel Aziz *et al.*, 2017).

Sin embargo, hasta ahora la información disponible en ganado vacuno de genotipo Holstein mestizo, criado bajo condiciones climáticas de trópico alto (sobre los 2.500



msnm) y mantenidas bajo un sistema de producción extensivo, es decir alimentadas solo con forraje proveniente del pastoreo a nuestro saber no existe, lo cual no permite utilizar la AMH para la selección de donadoras como se encuentra descrita en los estudios enunciados anteriormente en condiciones diferentes. Considerando que el sistema de crianza, las características medioambientales propias de la zona geográfica y la adaptabilidad que han logrado los animales en este medio, podrían generar cambios en su fisiología ovárica, como lo describen (Baldrighi *et al.*, 2014; Ayala *et al.*, 2019).



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

Determinar si los niveles de AMH guardan relación con la cantidad y calidad de ovocitos recuperados por OPU.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Determinar los niveles de hormona antimulleriana en vaconas Holstein mestizas y si estos niveles se relacionan con el recuento de folículos antrales al momento de reinicio de la onda folicular.
- Valorar la respuesta al protocolo de OPU expresada en cantidad y calidad de folículos observados y COC's recuperados.



### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. Concepto de *Ovum Pick Up* (OPU)

La técnica *ovum pick-up* (OPU, por sus siglas en inglés) es un procedimiento no invasivo por el cual se recolectan ovocitos de folículos antrales de más de 3 mm de diámetro en animales vivos. La técnica de OPU, fue utilizada en primera instancia para la reproducción asistida en humanos, empezándose a utilizar en la mujer en la década de 1980 pero no fue hasta 1987 que se realizó la primera propuesta de OPU en bovinos (López, 2017). OPU es una técnica muy utilizada en hembras de varios estados fisiológicos: cíclicas, no cíclicas, durante el primer tercio de la gestación, en la hembra de más de seis meses de edad, a partir de 2-3 semanas posparto y los que no responden a estímulos hormonales, por lo que no interfiere con los ciclo productivos o reproductivos de las hembras donantes (Peláez, 2011).

La recolección de ovocitos de animales vivos permite incrementar el número de embriones potenciales y de terneros producidos por donadora al año, además permite la disminución del intervalo generacional y ayuda a establecer esquemas que permitan incrementar la eficiencia productiva. La recuperación de ovocitos por punción transvaginal y su posterior maduración, fecundación y cultivo *in vitro* permite la producción de embriones que pueden ser criopreservados o bien transferidos a hembras receptoras (Peláez, 2011).

La optimización de OPU está basada en la frecuencia de muestreo, recolección de una a dos veces por semana, ya sea en animales a los que se les haya aplicado un protocolo hormonal u no hormonal de estimulación ovárica. Dando como resultado un aumento en



la frecuencia de las ondas foliculares o una detección del ciclo estral, la maduración del folículo y la ovulación (Boni, 2012).

No obstante, independiente de los alcances que ha tenido hasta hoy la técnica, existen diferentes factores como el sistema de manejo, la raza, la alimentación y el medio ambiente que pueden alterar el patrón de comportamiento del ovario, disminuyendo la efectividad de los protocolos de estimulación ovárica y por ende la calidad y cantidad de ovocitos competentes para PIV (Romero, 2019). Las hembras con severo estrés nutricional fallan en la ovulación del primer folículo dominante, posiblemente debido a que la frecuencia en el pulso de LH es reducida para estimular la suficiente secreción de estrógenos por parte del folículo dominante e inducir el pico preovulatorio de LH (Santi, 2018).

### **3.1.1. Protocolos de sincronización OPU**

Hace poco tiempo la aspiración folicular transvaginal era realizada en momentos aleatorios del ciclo estral. Sin embargo, la creciente necesidad de mejorar la eficiencia de la técnica, a modo que se pueda obtener mayor y mejor calidad de ovocitos apunta hacia el empleo de protocolos previos a la aspiración (Sarmiento & Naulaguari, 2019). El número de folículos disponibles para la aspiración folicular presenta grandes variaciones dependiendo de la fase del crecimiento folicular, siendo el inicio de la onda el momento más favorable para la recuperación. Es por esto que los protocolos deben permitir sincronizar la onda de crecimiento folicular de modo que se pueda realizar la aspiración al inicio de esta, dentro de los protocolos más empleados son: aumentar la frecuencia de aspiración y la utilización de protocolos hormonales a base de benzoato de estradiol (BE) y progesterona inyectables (Solís *et al.*, 2012).



Desde el descubrimiento de las hormonas que intervienen en el ciclo reproductivo, el hombre siempre ha buscado una mejora y un control sobre la actividad ovárica, usando la ultrasonografía para estudiar el efecto de diferentes tratamientos hormonales sobre la dinámica folicular permitiendo el desarrollo de protocolos que sean más eficientes en el manejo y control del ciclo estral y la ovulación. Hoy en día existen diferentes protocolos de sincronización de celo y de la ovulación los cuales presentan distintas ventajas, así como ciertos inconvenientes (Romero, 2019). Chaubal *et al.*, (2006) menciona, de las hormonas utilizadas, es decir, GnRH, FSH y eCG; la FSH por lo general es la que ha dado los mejores resultados en términos de número de folículos aspirados y ovocitos recuperados.

Actualmente, la OPU es un procedimiento estandarizado que permite la obtención de ovocitos en cualquier momento del ciclo estral. Sin embargo, con el objetivo de aumentar la tasa de recuperación y calidad ovocitaria, ha sido necesario la modificación de protocolos hormonales a fin de obtener grupos de folículos más homogéneos y que subsiguientemente darán lugar a embriones de mejor calidad. La mayoría de los protocolos apuntan a sincronizar el reclutamiento de la onda folicular y a estimular el final del crecimiento folicular y tal vez inclusive favorecer la maduración de los ovocitos (Vásquez, 2016).

### **3.1.1.1. Sincronización de emergencia de onda folicular**

Se ha demostrado que la sincronización de la onda folicular puede ser hecha de forma mecánica a través de la ablación del o los folículos dominantes o a través de la administración de fármacos que tienen su efecto sobre la dinámica folicular como los son el estradiol (E2) y la progesterona (P4), la aplicación de estos tratamientos ha tenido respuestas similares (Vásquez, 2016). Inicialmente la combinación de E2 y P4 tenía



como objetivo provocar la regresión de cuerpo lúteo, consecutivamente, se descubrió que dicha combinación causa atresia del folículo dominante y posteriormente el surgimiento de una nueva onda de crecimiento folicular, este surgimiento ocurre como consecuencia de la supresión de FSH y LH por el tiempo en el que es metabolizado el estradiol. Al finalizar dicho proceso surge un nuevo pico de FSH provocando la formación de una nueva onda de crecimiento folicular (Romero, 2019).

Sarmiento & Naulaguari, (2019), mencionan que el tratamiento exógeno más empleado para sincronizar el inicio de ondas foliculares durante muchos años han sido los esteroides de estradiol y los progestágenos, que inducen atresia folicular e inician una nueva onda 4 días después, en países que se ha restringido el uso de estradiol, han recurrido a la administración de GnRH para inducir la ovulación 1.5 a 2 días después.

Se ha sugerido un método alternativo, que consiste en suprimir mediante ablación mecánica el folículo dominante o folículos mayores a 5mm e inducir el reinicio de una nueva onda 1.5 a 2 días después (Sarmiento & Naulaguari, 2019). Provocando un aumento en los niveles de FSH en un corto periodo de tiempo y emergencia de una nueva onda folicular en 1.5 días después de la eliminación de los folículos independientemente del estado del ciclo estral en que se encuentre el animal (Romero, 2019).

#### **3.1.1.2. Estimulación ovárica**

Los procesos de superestimulación hormonal han sido desarrollados para estimular el crecimiento de folículos y destinar sus ovocitos a procesos biotecnológicos reproductivos como la transferencia de embriones (TE) u OPU acoplada a producción de embriones *in vitro* (PIV) (Sarmiento & Naulaguari, 2019). La aplicación de FSH-LH





como un tratamiento hormonal han sido ampliamente utilizados, sin embargo, es necesario las modificaciones de estos, por ejemplo, en las dosis y la duración de los tratamientos, ya que el objetivo principal de la estimulación ovárica previa a la OPU es generar folículos adicionales, en lugar de provocar la ovulación. La aplicación de FSH a distintas dosis incrementa el número de folículos aspirados y de ovocitos recuperados, además de proporcionar un mayor porcentaje de embriones transferibles en comparación con animales no estimulados (Romero, 2019).

En el trabajo realizado por Ongaratto, (2013), menciona que la estimulación ovárica con el uso de gonadotropinas ha sido reportada por diversos autores, con un aumento en la recuperación de ovocitos por OPU de hembras *Bos taurus* estimuladas en comparación con las que no fueron estimuladas. Esto pudo ser alcanzado al utilizar distintos procedimientos con gran variación del periodo entre la última aplicación de FSH y la recolección de ovocitos. También señala que la administración de FSH aumentó el número de folículos aspirados y el número de ovocitos recuperados grado A, y un incremento en el número de embriones transferibles cuando eran utilizadas múltiples dosis de la hormona. Esos resultados muestran que el tratamiento con múltiples dosis de FSH antes de la aspiración mejora el número de folículos disponibles y la calidad de ovocitos recuperados y embriones producidos.

### **3.1.2. Técnica de aspiración folicular *Ovum pick up* (OPU)**

Para la realización de la OPU resulta indispensable disponer de tres componentes: un equipo de ultrasonido (ecógrafo) con su respectivo transductor, una bomba de aspiración y un sistema guía de ajuga conectado al tubo colector (López, 2017).



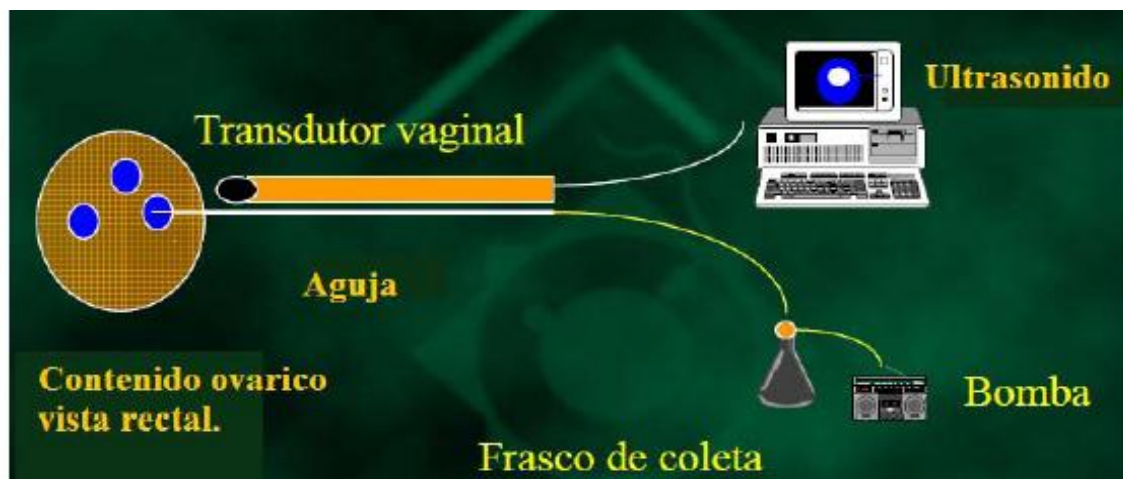
Los pasos para la aspiración folicular (OPU) se puede separar en dos partes importantes resumidas de la siguiente manera:

### **3.1.2.1. A nivel de campo**

En el trabajo realizado por Samaniego, (2017), cita el siguiente protocolo que se explica a continuación:

1. Una vez seleccionadas las donantes de ovocitos se las introducirá en una manga de contención, seguida de la aplicación de xilacina al 2% (0,02mg/kg).
2. Continuo a este, se realiza el vaciamiento del contenido rectal y lavado de la región perineal.
3. Minutos más tarde, se procede a la administración de lidocaína al 2% (0,4mg/kg) vía epidural, para reducir los esfuerzos expulsivos y facilitar la manipulación del ovario, seguido a esto se realiza la limpieza y desinfección exhaustiva de la región perineal.
4. Posteriormente, se introduce el transductor por vía vaginal hasta posicionarse según el ovario a puncionar. Con la mano izquierda introducida por vía rectal fijar el ovario a la cabeza del transductor hasta ser visualizado en la pantalla y manejo del mango de OPU con la mano derecha.
5. Seguido a este movimiento se ingresa la guía de punción siguiendo su trayectoria en pantalla.
6. Una vez ubicado los folículos se procede a empujar suavemente la aguja, penetrando la pared de vaginal y luego la folicular, aspirando el contenido folicular y depositándose en un recipiente junto a un medio de aspiración atemperado (PBS + heparina 2,2 UI/ml y suero fetal bovino).

La punción de los folículos puede realizarse con diferentes tipos de agujas, largas o cortas, generalmente de 18G, acompañada de una línea de aspiración (tubo de silicona), conectada a tubos falcón de 50 ml. Con una presión de aspiración ajustada entre 50 a 85 mmHg (Santi, 2018).



**Figura 1:** Sistema de ovum pick up (OPU)

**Fuente:** Peláez, (2011).

### 3.1.2.2. A nivel de laboratorio

Samaniego, (2017), menciona que el fluido de cada animal contenido en un tubo falcón de 50 ml será inmediatamente filtrado. Los residuos de sangre serán eliminados por lavados continuos en PBS a temperatura ambiente y se pasará a una placa Petri para localizar y evaluar morfológicamente a través de un estereoscopio los complejos cúmulo ovocito (COC's) aspirados.

Para la clasificación morfológica se utiliza la escala más común la misma que valora entre 1-5 considerando el aspecto del citoplasma y el número de capas que constituye el cúmulo.

De acuerdo con Romero, (2019), morfológicamente se clasifican en:

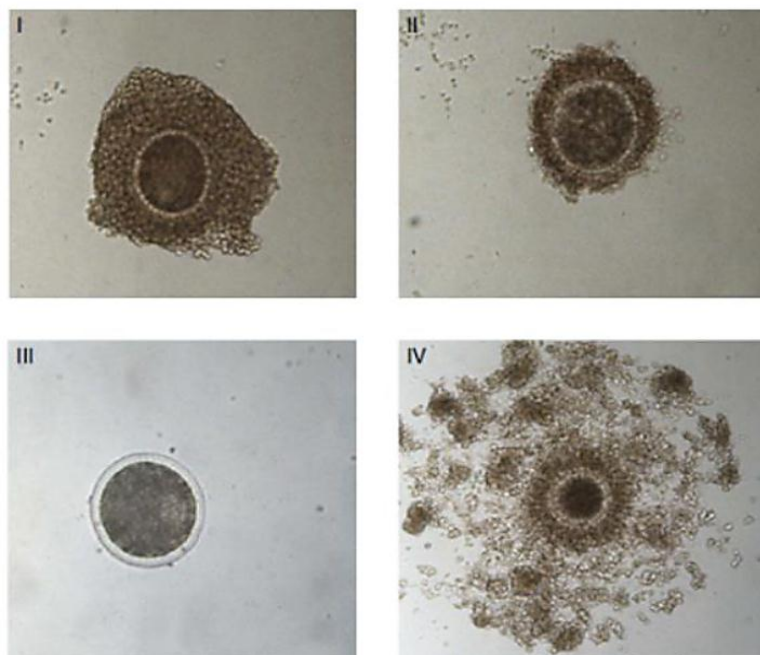
**Tipo A o Categoría I:** Ovocito con más de cuatro capas, cúmulus compacto, citoplasma homogéneo y uniformemente granuloso.

**Tipo B o Categoría II:** Ovocitos con menos de tres capas en su cúmulo, citoplasma homogéneo.

**Tipo C o Categoría III:** Ovocitos con mono capa de células del cúmulus y citoplasma de apariencia irregular con áreas oscuras.

**Tipo D o Categoría IV:** Ovocito desnudo.

**Tipo E o Categoría V:** Ovocito maduro con células del cúmulus expandido.



**Figura 2:** Clasificación morfológica de los COC's. **I:** ovocito tipo A, **II:** ovocito tipo B, **III:** ovocito tipo C, **IV:** ovocito tipo D.

**Fuente:** Sarmiento & Naulaguari, (2019).

### 3.2. Hormona Antimulleriana (AMH)

La AMH es una glicoproteína producida por las células de la granulosa de los folículos ováricos en crecimiento y sus receptores se expresan en las células granulosa y la teca



de los ovocitos. Sus funciones son: la inhibición del crecimiento de folículos primordiales que se encuentran formando la reserva ovárica, y por lo tanto evitan el agotamiento prematuro y la modulación del desarrollo folicular. Debido a que la AMH se correlaciona con el tamaño de la reserva ovárica, puede usarse para predecir la fertilidad y la longevidad reproductiva en hembras bovinas (Alcívar & Arteaga, 2019).

Actúa inhibiendo la fase de crecimiento folicular dependiente de FSH, la acción específica de esta hormona sucede entre las semanas 9 y 10 en la mayoría de las especies en gestación durante la etapa de diferenciación del embrión (Ricárdez, 2015). La evaluación de la población folicular ovárica (AFP) por conteo o por medio de marcadores endócrinos, pueden ser herramientas útiles para predecir el éxito de biotecnologías reproductivas en el ganado, de ese modo, se ha identificado esta hormona como un importante marcador de la respuesta endocrina a la superovulación y la producción de embriones *in vitro* en bovinos (Baruselli *et al.*, 2015).

Se ha encontrado que la AMH en plasma en las vaquillas *Bos indicus* y *Bos taurus* tiene una correlación positiva con los folículos totales aspirados, los complejos de ovocitos de cúmulos totales (COC's) recuperados, el número de COC's cultivados y el número de embriones producidos por sesión de OPU. Sin embargo, algunas variables relacionadas con el desarrollo embrionario *in vitro* (tasas de escisión y blastocisto) no parecen tener ninguna correlación con la AMH circulante (Alcívar & Arteaga, 2019).

Estudios actuales han demostrado que los ovocitos recolectados *in vivo* por la aspiración folicular ofrecen una mayor competitividad a la hora de desarrollarse a blastocisto comparados con los ovocitos obtenidos de ovarios de rastro. Incluso esta técnica asociada a la producción de embriones *in vitro* ha tenido comparaciones con la



producción de embriones *in vivo* por métodos de superovulación, reportándose en un estudio realizado en vacas Holstein donde se obtuvieron mejores resultados en la producción de un mayor número de mórulas y blastocistos por OPU-FIV ( $11.8 \pm 7.6$ ), que la ovulación múltiple ( $6.4 \pm 6.3$ ) por lo que esta biotecnología podría ser una opción a la transferencia de embriones por superovulación (López, 2017).

### **3.2.1. Funciones de la AMH específicas del ovario**

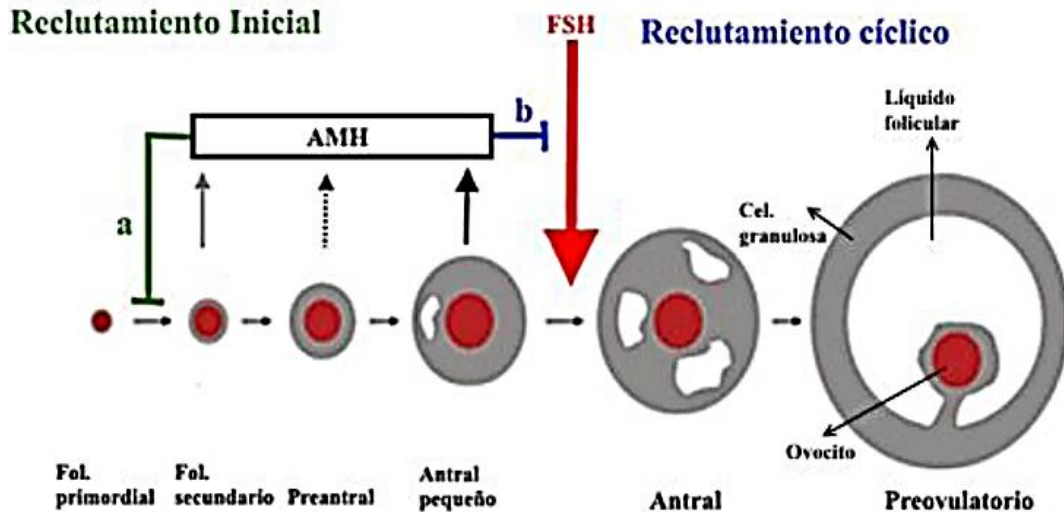
#### **3.2.1.1. Inhibe el reclutamiento de folículos primordiales en crecimiento**

Este desarrollo es la transición del folículo primordial a primario, en el que el folículo va creciendo sucesivamente. Por lo tanto, la ausencia de AMH resultaría en un número mayor de folículos primordiales siendo reclutados para continuar el crecimiento folicular, y se obtendrá un mayor número de folículos preovulatorios. De este modo, la AMH actuaría como con un feedback negativo en el número de folículos presentes en el ovario, modulando el crecimiento folicular prematuro e inhibiendo un número excesivo de folículos, evitando así un agotamiento prematuro de la reserva folicular ovárica (Cabrer, 2019).

#### **3.2.1.2. Inhibe la estimulación de la FSH a los folículos en crecimiento**

Se ha observado que la AMH puede ser uno de los factores involucrados en determinar la capacidad de respuesta de cada folículo a la FSH durante el reclutamiento cíclico. Con expresiones nulas de AMH los folículos tienen una respuesta mayor a la FSH por un aumento de la sensibilidad a esta hormona, dejando que los folículos sean seleccionados para seguir creciendo y obteniendo así un número elevado de folículos en crecimiento. Por lo tanto, la AMH tiene un papel importante inhibiendo la sensibilidad

de los folículos a la FSH ya que de esta manera habrá menos folículos que serán reclutados por crecer hasta la fase preovulatoria (Cabrer, 2019).



**Figura 3:** La AMH es secretada por folículos pre-antrales (líneas discontinuas) y antrales (líneas continuas). Se ha postulado que inhibe el reclutamiento de folículos primordiales (a. reclutamiento inicial) y el crecimiento de folículos FSH-dependientes (b. reclutamiento cíclico).

**Fuente:** Céliz, (2017).

### 3.2.2. Técnica de diagnóstico para la determinación de AMH (ELISA)

La técnica más utilizada para determinar concentraciones de hormonas es la técnica de Elisa. La más utilizada es la denominada Elisa en sándwich, la cual utiliza dos anticuerpos reactivos con diferentes epitopos del antígeno cuya concentración se desea determinar (Abbas *et al.*, 2012). La técnica de Elisa en sándwich se utiliza para identificar un antígeno específico de la muestra. La superficie de los pocillos se prepara con una cantidad límite de anticuerpos conocida, para capturar el antígeno. Después de la unión no específica se bloquean los sitios libres de la placa utilizando albúmina de suero bovino. Se agrega la muestra a la placa y a continuación se añade un anticuerpo



primario específico para el antígeno. Después se agrega un anticuerpo secundario ligado a enzimas, que se unen al anticuerpo primario, conjugados anticuerpo-enzima no unido se eliminan mediante lavado. Se añade el sustrato que es enzimáticamente convertido y genera un color que puede ser cuantificado (Gan & Patel, 2013).

### **3.3. Producción de embriones *in vitro* (PIV)**

En la actualidad la producción de embriones *in vitro* (PIV) es una de las biotecnologías más importantes que han aportado la reproducción asistida, permitiendo aumentar la producción, selección y comercialización de embriones bovinos (Fernández *et al.*, 2007). A partir de la PIV se dio inicio al desarrollo de nuevas biotecnologías como la clonación, la micro manipulación de embriones, etc. (Gonella *et al.*, 2013); diversas herramientas que permiten manipular la actividad reproductiva con el fin de propagar con rapidez los animales superiores y sus genes, con el propósito de mejorar la calidad de sus productos. Al igual que la implementación de métodos hormonales para provocar superovulación o el desarrollo de métodos efectivos para la obtención de ovocitos en los animales vivos de interés zootécnico (OPU) (Fernández *et al.*, 2007).

En bovinos, se ha confirmado la eficiencia de estas biotecnologías, pues OPU y PIV para la producción de embriones de animales de élite se han comercializado cada vez más en la industria de la cría de ganado, el aumento de la producción de ovocitos y embriones de estos animales de élite durante un intervalo limitado es obviamente una clave para la aplicación exitosa de técnicas de reproducción asistida (Chaubal *et al.*, 2006). Es importante señalar su aplicación para activar la función génica en animales que no responden a los tratamientos de superovulación, en vacas enfermas y en aquellas destinadas para el sacrificio (Fernández *et al.*, 2007).





La adopción de biotecnologías ha permitido obtener gran cantidad de ovocitos para la PIV, a partir de ovarios obtenidos de vacas o novillas del matadero (Fernández *et al.*, 2007). Así como también la recolección repetida de ovocitos *in vivo* mediante OPU (Boni, 2012), los cuales han sido inseminados (FIV) con semen de alto valor genético, logrando recuperar gran número de embriones con potencial genético mejorado. Por otro lado, en bovinos apenas entre el 20 y 50% de los ovocitos fertilizados *in vitro*, terminan siendo embriones viables, sin embargo la tasa de fertilidad puede verse afectada entre un 30 a 40% en función de la calidad de estos embriones, por cuanto la calidad embrionaria se ha correlacionado con una mortalidad embrionaria temprana, primeros 30 días de gestación (Fernández *et al.*, 2007).

#### **3.4. Protocolo para producción de embriones *in vitro* (PIV)**

La producción de embriones *in vitro* es una biotecnología reproductiva con un gran potencial en el mejoramiento genético porque permite un acortamiento del intervalo generacional y logra aumentar la propagación del material genético de todos los animales que sobresalen del resto del hato. Además, se han venido utilizando a los embriones como modelos para la investigación de procesos metabólicos, genéticos y del desarrollo de otras especies, incluso la especie humana. La PIV involucra las etapas de colecta, maduración (MIV), y fertilización *in vitro* (FIV) como tal. PIV es utilizada para acelerar la producción de animales genéticamente superiores y para impedir, por medio de la aspiración *in vivo* de folículos, el descarte precoz de hembras genéticamente privilegiadas portadoras de alteraciones adquiridas (no transmisibles genéticamente a su descendencia) que impidan que la reproducción ocurra de manera natural (Gonella *et al.*, 2013).



### 3.4.1. Métodos empleados para la recolección de ovocitos

Ramírez & Jiménez, (2010), indican que la recolección de ovocitos para el desarrollo de tecnologías *in vitro* se puede realizar en dos formas:

- Recolección en animales post-mortem, se puede recoger por aspiración de folículos visibles de 2-5mm de diámetro con jeringas de 5-10cc y aguja de calibre 18G, o mediante el método de corte de la superficie e interior del ovario con cuchillas separadas por 2 mm.
- Recolección en animales vivos, se la puede realizar por aspiración transvaginal guiada por ultrasonido que se puede realizar durante todos los estados del ciclo estral, durante el primer trimestre de gestación y aún en animales prepúberes, y por laparoscopia/laparotomía.

En un estudio realizado por Quintana *et al.*, (2012), indican que el método por disección quirúrgica de los folículos es más eficiente que la punción o aspiración folicular, se menciona que con la aspiración se obtienen menor cantidad de COC's que con la disección folicular, ya que, por punción folicular se aspiran folículos de 2 a 8mm de diámetro, mientras que el método de disección involucra una mayor proporción de la población folicular. No obstante, se reportan una mayor tasa de desarrollo en embriones producidos por FIV de ovocitos obtenidos por aspiración con respecto al método de disección (Quintana *et al.*, 2012). Alvarado, (2017), también reporta que la cantidad de ovocitos de clase A y B obtenidos de las hembras jóvenes de raza criolla alcanza el 55,7% del total de ovocitos recuperados por la técnica OPU, mientras que la tasa de ovocitos recuperados de ovarios de matadero por medio de aspiración folicular fue de 67,2%.



### 3.4.2. Sistema de producción *in vitro* de embriones

El proceso de producción *in vitro* de embriones bovinos puede dividirse en tres pasos fundamentales, los cuales, independientemente del protocolo utilizado, en orden cronológico son:

- **Maduración de ovocitos**

La maduración de ovocitos es un proceso complejo que comprende maduración nuclear (reanudación de la meiosis y progresión de la vesícula germinal) a la metafase II, y maduración citoplasmática (migración de organelas como gránulos corticales, mitocondrias y cambios bioquímicos en el citoplasma). Los ovocitos para ser fértiles tienen que pasar por un proceso, de desarrollo y diferenciación para que alcance la metafase II. La maduración depende de la interacción de varios factores como, la temperatura, osmolaridad, pH y concentración de hormona siendo esta última el factor más importante (Estrella & Suconota, 2018).

Los embriones producidos *in vitro* son capaces de alcanzar la etapa de blastocistos mediante la utilización de varios medios de maduración y para ello un gran número de medios, bajo diferentes condiciones y protocolos (Espin, 2018). De este modo la composición de los medios y el ambiente controlado por estufas de cultivo, deben brindar un ambiente adecuado para que la maduración ocurra en 24hs de un modo similar a lo que sucede *in vivo* en el bovino (Peláez, 2011).

Las condiciones utilizadas en la mayoría de los laboratorios para lograr este ambiente, involucra el uso de medios de cultivo tales como el medio de cultivo tisular 199 (TCM 199), suplementado con hormonas (LH, FSH, estradiol, etc.), antioxidantes (glutatión,



cisteamina, cistina), factores de crecimiento y macromoléculas (suero, albumina), en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 38,5°C y humedad a saturación (Peláez, 2011).

El fluido sintético de oviducto (SOF), es un medio simple cuya composición está basada en el análisis bioquímico del fluido de oviducto ovino, más el segregado de albumina sérica bovina (BSA). La capacidad del SOF para promover el desarrollo embrionario mejora cuando el cultivo se efectúa en una atmósfera con baja tensión de oxígeno (5-7%). El SOF no es un medio ideal para MIV, sin embargo, es un medio que fácilmente puede ser suplementado con diversas sustancias debido a su composición más simple ya que sus componentes son más específicos siendo más fácil para investigar su acción al contrario del TMC, cuya composición es compleja (Espin, 2018).

El suero añadido al medio de maduración *in vitro* a menudo permite una mejora en la calidad del ovocito, en la tasa de fertilización y en el desarrollo embrionario. La eficiencia en la función de las células del cúmulo durante la maduración *in vitro* de los ovocitos, se reportaron principalmente por la utilización de suero al medio de maduración. Su uso, sin embargo, oculta la comprensión auténtica de las funciones de las células del cúmulo o de los componentes químicos añadidos durante el proceso de maduración (Espin, 2018).

- **Fecundación de ovocitos maduros**

Consiste en incubar los óvulos madurados con espermatozoides vivos y móviles durante un periodo de 6 a 24 horas, luego de un proceso de selección y capacitación espermática que nos permitirá deshacernos de componente del plasma seminal, crioprotectores y espermatozoides muertos o con escasa vitalidad. En el caso de la fecundación *in vitro*, los ovocitos maduros son cocultivados con espermatozoides en medios especiales y en



un ambiente controlado por estufas de cultivo por un tiempo comprendido entre 5-24 horas dependiendo del protocolo, la concentración de espermatozoides y la calidad del semen utilizado (Peláez, 2011).

El semen debe ser tratado antes de cocultivar los espermatozoides con los ovocitos, esto se logra mediante técnicas, las más utilizadas son basadas en la migración de los espermatozoides (swim up) y la centrifugación en gradientes de densidad (percoll). Por último se efectúa la dilución y el conteo de los espermatozoides móviles para alcanzar habitualmente una dosis inseminante de 1-6 millones de espermatozoides por ml de medio de fecundación dependiendo del protocolo utilizado (Peláez, 2011). El ovocito maduro, permanece en metafase II hasta su fertilización, al ser fecundado, completa la meiosis II y extrude el 2º corpúsculo polar. La cabeza del espermatozoide forma el pronúcleo masculino y el núcleo del ovulo el pronúcleo femenino, los cuales se fusionan para completar el número diploide. Para realizar FIV los COC's maduros son lavados y se colocados en gotas de inseminación junto con el medio de fecundación el cual contiene los espermatozoides (Estrella & Suconota, 2018).

- **Cultivo de embriones (CIV)**

Finalizada la etapa de fertilización *in vitro*, los ovocitos fertilizados son sometidos a la etapa de cultivo. El objetivo de esta etapa es permitir que lo ovocitos fertilizados se desarrollen hasta un estadio embrionario en la que se pueda realizar la trasferencia a la hembra receptora (Gonella *et al.*, 2013). Los embriones resultantes de FIV son cambiados del medio de fecundación a un medio de cultivo, continúan su división celular (8, 16, 32 células) hasta llegar a mórulas y blastocitos. Durante esta etapa destacan la presencia en el medio de cultivo de diversas fuentes de energía como la glucosa y aminoácidos esenciales y no esenciales (Estrella & Suconota, 2018).



Se citan dos sistemas de cultivo, los sistemas abierto y cerrado, de las cuales el sistema cerrado es de mayor interés, ya que, el modo más corriente de efectuar este tipo de cultivo es el de las “microgotas”. Las microgotas, consiste en colocar un determinado número de gotas, habitualmente con un volumen de 50 o 100  $\mu\text{l}$ , en una placa petri y recubiertas posteriormente con aceite de parafina o silicona. El agua no se evapora fácilmente, pero algunos de los componentes del medio pueden ser soluble en aceite; por ello, hay que equilibrarlo, antes de iniciar el periodo de cultivo. El sistema de microgotas permite una identificación individual de los oocitos, minimiza los riesgos de contaminación y facilita el cultivo independiente de los oocitos y una observación de los mismos más fácil que con otros sistemas (Espin, 2018).



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1. Materiales Biológicos

- Hormonas
  - Dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (1,3 g)
  - Benzoato de estradiol (Gonadiol<sup>®</sup>)
  - Dinoprost Trometamina (Lutalyse<sup>®</sup>)
- Vaconas Holstein mestizas

#### 4.1.2. Materiales Químicos

- Gel lubricante
- Alcohol 70%
- Medio de recolección PBS
- Kit de Elisa
- Lidocaína 2% (Roxicaina<sup>®</sup>)
- Xilacina 2% (Dormi-xyl<sup>®</sup>)
- Heparina
- Amonio cuaternario 10%

#### 4.1.3. Materiales Físicos

- Equipo de ultrasonido
- Transductor sectorial
- Equipo de OPU
- Lector de placas de ELISA
- Jeringas de 10-20 ml.
- Tubos 3k EDTA 4 ml
- Agujas vacutainer
- Cooler
- Bomba de aspiración
- Sistema de Guía de Aguja con aguja larga desechable 20G



- Set de mangueras
- Torundas de alcohol
- Guantes Nitrilo
- Guantes Ginecológicos
- Cámara fotográfica
- Teléfono móvil
- Materiales de oficina
- Cuaderno de campo
- Esferos
- Medios extraíbles (Memory USB)
- Marcadores

#### **4.1.4. Materiales de Laboratorio**

- Micropipetas
- Puntas de pipetas automáticas
- Capilares
- Pipetas automáticas
- Placas petri cuadrículadas
- Estéreo microscopio
- Tubos eppendor
- Tubos Falcón
- Platina de calefacción
- Filtro EMCOM



## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Área de estudio



**Figura 4:** Ubicación del área de estudio (Azuay).

**Fuente:** Directorio cartográfico de Google Maps, 2019.

### 4.2.2. Ubicación política-geográfica

La investigación se realizó en ganaderías que se encuentran ubicadas en la provincia del Azuay (región sur del Ecuador). Esta se encuentra constituida por 15 cantones, 27 parroquias urbanas y 60 parroquias rurales. Posee dos zonas, el área denominada los Andes (oriental y occidental) y la zona costanera (oeste). El clima es variable desde el tropical hasta el glacial. Presenta dos estaciones definidas: húmeda y seca. En el Occidente la temperatura oscila entre los 20 °C y 33 °C, mientras que, en la zona andina, ésta suele estar entre los 10 °C y 28 °C (Gañan & Londa, 2020).

### 4.2.3. Unidades experimentales

Se realizaron dos experimentos:



- El primer experimento determinó los niveles plasmáticos de hormona Antimulleriana (AMH) y su relación con el recuento de folículos antrales (RFA) presentes en el reinicio de la onda folicular. Para ello se valoraron 61 vacas Holstein mestizas, edad comprendida entre 16 a 24 meses, criadas sobre los 2.500 msnm, en sistemas pastoriles.
- El segundo experimento evaluó la cantidad y calidad de folículos disponibles durante cada sesión de OPU, en 5 vacas de raza Holstein Mestizas del grupo de baja y 5 vacas de grupo de alta concentración de AMH, determinadas en el experimento 1.

#### **4.2.4. Diseño experimental**

**4.2.4.1. Experimento 1:** Fue un trabajo de tipo descriptivo, se determinó las siguientes variables:

- Nivel plasmático de hormona Antimulleriana (AMH)
- Recuento de folículos antrales (RFA), en el momento del reinicio de la onda folicular.
- Correlación entre el RFA y la AMH en el total de animales en estudio.
- Valoración del número de folículos antrales en los grupos de alta, media y baja concentración de hormona Antimulleriana (AMH).

El estudio se desarrolló con 61 vacas Holstein mestizas que estuvieron dentro de un rango de edad de 16 a 24 meses, criadas sobre los 2.500 msnm, en sistema pastoril.

#### **Criterios de inclusión:**

- Vacas de raza Holstein Mestizas
- Criadas sobre los 2.500 msnm



- Edad entre 16 a 24 meses
- Cíclicas
- CC de 2,5 a 3 (1-5), de acuerdo a lo descrito por (Song *et al.*, 2019)
- Sanas

**Criterios de exclusión:**

- Vaconas que no ovularon luego del protocolo de sincronización
- Animales que se enfermaron o murieron durante el experimento

**Desarrollo experimental:**

En primera instancia se seleccionaron ganaderías, dentro de la provincia del Azuay que posean vaconas que cumplan los criterios de inclusión descritos.

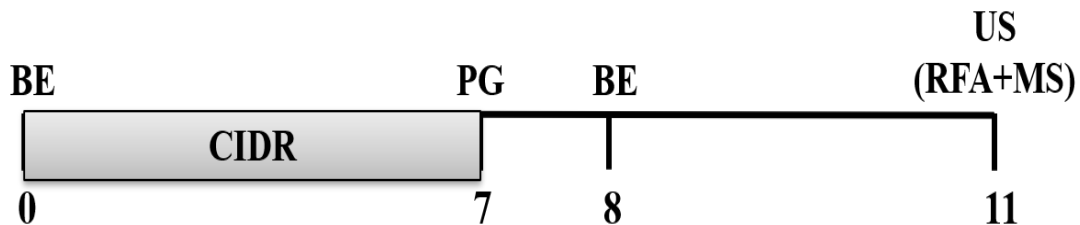
*Protocolo de sincronización de la onda de crecimiento folicular:*

El día 0 de inicio del protocolo se colocó un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (DIV 1.3 g) + 2 mg de BE (Gonadiol<sup>®</sup>), vía im. Día 7 por la mañana (06h00) se aplicó una dosis de 25 mg de un agente luteolítico a base de Dinoprost Trometamina (Lutalyse<sup>®</sup>) y se retiró el implante, más la aplicación de un parche detector de celo. El día 8, las vaconas recibieron 1 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol<sup>®</sup>), vía im. (**Fig 5**).

*Recuento de folículos antrales (RFA)*

El recuento de folículos antrales (RFA) fue realizado el día 11 del protocolo, para esto los ovarios fueron escaneados transrectalmente con un ecógrafo provisto de un transductor lineal de 7.5 MHz (Aloka ProSound 2<sup>®</sup>, Tokyo-Japón). Se contabilizaron los folículos antrales  $\geq 4$ mm, utilizando la técnica descrita por Ayala *et al.*, (2019),

brevemente esta consiste en un barrido latero-medial, dorso-ventral y cráneo-caudal, primero del ovario derecho y luego el izquierdo (**Fig 5**).



**Figura 5:** Esquema del protocolo de sincronización de la onda de crecimiento folicular. Evaluación ultrasonográfica y toma de muestra de sangre, para la determinación de la concentración de Hormona Antimulleriana y recuento de folículos  $\geq 4$ mm. RFA=recuento de folículos antrales. US=ultrasonografía. MS=toma de muestras de sangre. BE=benzoato de estradiol. PG=prostaglandina. FPO=folículo preovulatorio. CIDR=dispositivo de progesterona.

#### *Determinación de la concentración plasmática de la Hormona Antimulleriana (AMH)*

El día 11 del protocolo por la mañana se procedió a extraer una muestra sanguínea, en tubos al vacío con EDTA (Vacutainer<sup>®</sup>), mediante punción de la vena coccígea. Inmediatamente después de la extracción las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, y el plasma obtenido se retiró y almacenó en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta el posterior análisis de la AMH.

La concentración plasmática de AMH fue determinada mediante el kit ELISA tipo sándwich, (kit DL-AMH-b, Develop<sup>®</sup>, China), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la prueba se basó en la intensidad del color mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 450 nm. El kit de acuerdo con el fabricante presentó una sensibilidad del ensayo inferior a 0.117 ng/ml, mientras que los coeficientes de variación inter e intra-ensayo fueron  $<10$  y  $<12\%$  respectivamente.



### **Formación de grupos de alta, media y baja concentración de AMH:**

Una vez determinado la concentración plasmática de AMH de cada una de las 61 vaconas en estudio, estas fueron divididas en tres grupos de acuerdo con los niveles de AMH: grupo de alto nivel de AMH ( $>0,25$  ng/ml;  $n=16$ ), grupo con nivel medio de AMH ( $0,05-0,25$  ng/ml;  $n=26$ ) y grupo de bajo nivel de AMH ( $<0,05$  ng/ml;  $n=19$ ).

#### **4.2.4.2. Experimento 2:** Fue de tipo descriptivo cuasi experimental.

Con la información de los niveles plasmáticos de las 61 vaconas evaluadas en el experimento 1, se tomaron al azar 5 vaconas clasificadas con alta concentración ( $>0,25$  ng/ml) y 5 de baja ( $<0,05$  ng/ml) concentración de AMH. Estos animales recibieron tres sesiones de OPU cada uno.

#### **Grupos:**

- G1=5 vaconas con niveles altos de AMH, G2=5 vaconas con niveles bajos de AMH

#### **Criterios de inclusión:**

- Vaconas de raza Holstein Mestizas valoradas en el experimento 1
- Nivel plasmático de AMH  $>0,25$  ng/ml (G1)
- Nivel plasmático de AMH  $<0,05$  ng/ml (G2)
- Cíclicas
- CC de 2,5 a 3 (1-5) la CC fue valorada según los criterios de (Song *et al.*, 2019).

#### **Criterios de exclusión:**

- Vaconas que enfermaran durante las sesiones de OPU

#### **VARIABLES EVALUADAS:**

- Número de folículos entre 5-8mm observados en los dos ovarios, previo a cada sesión de OPU



- Número de COC's recuperados
- Número de COC's tipo A, B, C y D obtenidos en cada sesión de OPU, clasificación propuesta por (De Loos *et al.*, 1989).
- Número de COC's clasificados como aptos y no aptos para la producción de embriones de acuerdo a lo descrito por (Ayala *et al.*, 2020).

## **Desarrollo del experimento E2:**

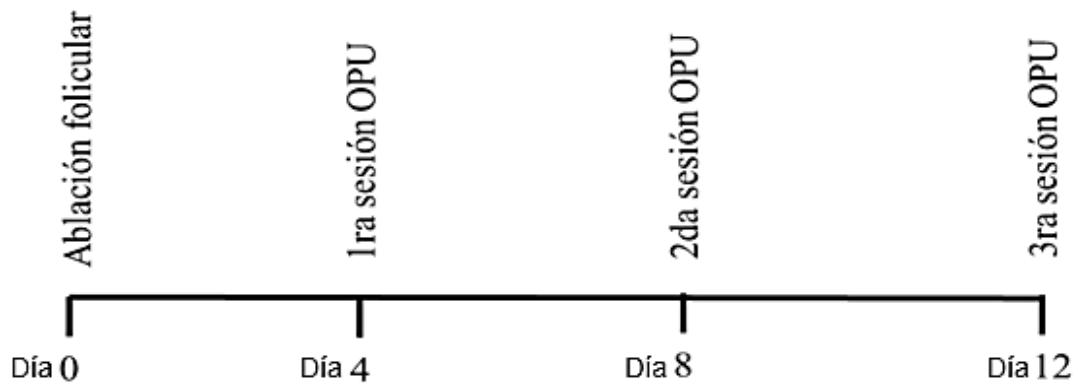
### *Preparación de las vaconas para las sesiones de OPU:*

Las vaconas 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) mediante una mezcla de lidocaína al 2% (Roxicaina<sup>®</sup>) y xilacina al 2% (Dormi-xyl<sup>®</sup>).

### *Valoración y aspiración de los folículos disponibles en cada sesión de OPU:*

Los ovarios se visualizaron y todos los folículos entre 5 y 8 mm fueron en primera instancia contados. Luego se procedió a la aspiración de estos utilizando un escáner de ultrasonido portátil (Prosound 2, Aloka, Japón), equipado con un transductor sectorial de 7.5 MHz ensamblado en un soporte de sonda, utilizado por vía transvaginal. Este último contenía la guía de punción conformada por una aguja hipodérmica desechable (1.2 x 75 mm) conectada en un extremo a un tubo cónico de 50 ml, a través de un sistema de teflón y el otro a una bomba de aspiración al vacío (WTA BV 003D, Brasil) con una presión regulada a 70 mmHg. Se usó solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con antibiótico y heparina como medio de recolección de COC's,

que se mantuvo a 37 °C mientras se realizaba la OPU. Para lograr sincronizar la onda folicular antes de la primera sesión de OPU, se realizó ablación de los folículos >5mm de los dos ovarios de cada una de las vaconas y a continuación se realizaron tres sesiones de OPU (**Fig 6**).

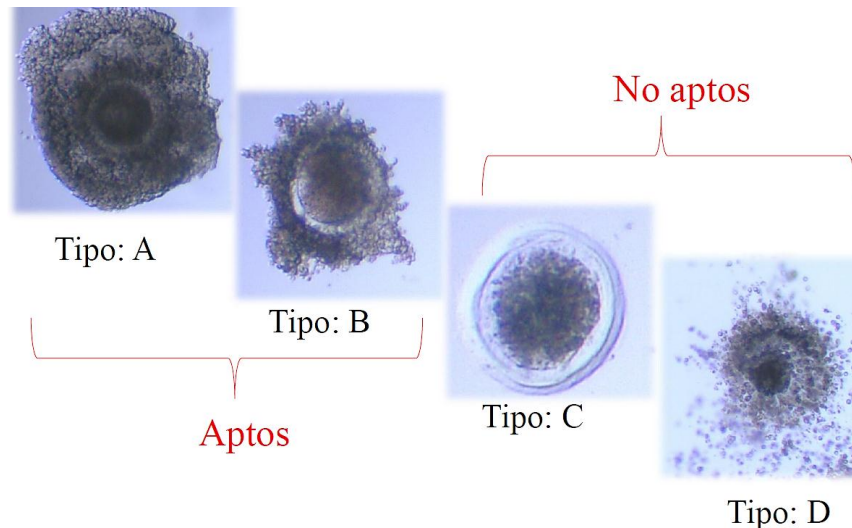


**Figura 6:** Protocolo de sesiones de OPU en cada uno de los grupos experimentales (G1; G2).

*Evaluación de los COC's aspirados por OPU:*

Inmediatamente después de la sesión OPU, el contenido del tubo se pasó a un filtro EmCon (Zona™, Agtech, USA), y este fue transferido a una placa Petri cuadrículada de 95 mm. Bajo un estereoscopio (SMZ 745, Nikon, Japón), los COC's fueron identificados y clasificados morfológicamente en primera instancia según los criterios descritos por (De Loos *et al.*, 1989). Brevemente: Calidad A; apariencia compacta, con múltiples capas (>4) de células de cúmulus, citoplasma granular uniforme y transparente; Calidad B: con 1 a 3 capas de células de cúmulus que cubrían la zona pelúcida, con citoplasma opaco que fuese total o parcialmente homogéneo y finamente granuloso; Calidad C: parcial o totalmente desnudos, citoplasma con áreas oscuras irregulares; Calidad D: células del cúmulus completamente expandidas y decoloradas.

Luego los COC's fueron reagrupados en aptos (Tipo A y B) y no aptos (Tipo C y D) para la producción de embriones *in vitro*, como lo describió (Ayala *et al.*, 2020).



**Figura 7:** Clasificación morfológica de los COC's.

**Fuente:** Ayala *et al.*, (2020)

#### 4.2.5. Análisis estadístico:

Los datos fueron tabulados en Excel y el análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS® versión 25. Se establecieron estadígrafos principales en los experimentos. Los niveles de la hormona Antimulleriana de las 61 vaconas se expresan en medias y desviación estándar, así como sus valores mínimos y máximos. Para determinar la correlación entre el RFA y la AMH se utilizó la prueba de Pearson; además, se aplicó regresión lineal simple.

Para la organización de las 61 vaquillas en grupos con alta ( $n=16$ ;  $>0,25$  ng/ml), media ( $n=26$ ; entre 0,05-0,25 ng/ml) y baja ( $n=19$ ;  $<0,05$  ng/ml) concentración de hormona Antimulleriana se utilizó terciles.





Para comparar el número de folículos, COC's y el número dentro de cada tipo de clasificación (A; B; C; D) o (aptos y no aptos) en los grupos de vaquillas (con alta y baja concentración de AMH), se utilizó la prueba de T de Student.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Concentración plasmática media de hormona Antimulleriana (AMH)

La concentración media plasmática de la hormona Antimulleriana medida en el día 0, momento determinado en nuestro estudio como el reinicio de la onda folicular fue de  $0,13 \pm 0,01$  ng/mL en todas las vaquillas Holstein mestizas, este valor plasmático se ubicó entre un valor mínimo de 0,03 y máximo 0,40 ng/mL (**Tabla 1**). El valor plasmático de AMH reportado en este estudio fue menor al reportado por Baldrighi *et al.*, (2014), quienes encontraron una concentración de (0,24 ng/mL) en vaconas Holstein en condiciones subtropicales de Brasil. La diferencia de concentración de AMH de nuestro estudio se acentúa aún más si lo comparamos con el estudio de Guerreiro *et al.*, (2014), quienes reportan valores de ( $0,3 \pm 0,03$  ng/mL) en vaquillas Holstein en la misma condición de clima subtropical.

La variación entre la concentración plasmática de AMH entre nuestro estudio con respecto a los otros estudios con los que se comparó quizás se deba al tipo de Kit empleado para la cuantificación de AMH, en nuestro estudio se utilizó un kit de Elisa tipo sándwich, DL-AMH-b (Develop<sup>®</sup>), China; mientras que en el estudio de Baldrighi *et al.*, (2014), se utilizó el kit de Elisa Ansh Labs, Webster, TX, USA y en el de Guerreiro *et al.*, (2014), se usó el kit Bovine AMH enzyme-linked immunosorbent assay AL-114 kit (Ansh Labs, USA). Muchos estudios han determinado que la sensibilidad de los kits de Elisa puede ocasionar una variabilidad en la concentración hormonal.

La diferencia en las concentraciones máximas de la AMH entre los trabajos antes mencionados y en esta investigación, podrían ser el nivel genético de las vacas utilizadas (Holstein puras vs. Holstein mestizas), así como, el sistema de manejo y alimentación (estabuladas vs. pastoreo) y condiciones ambientales propias de la zona de



trabajo (trópico bajo y trópico alto), las primeras, son regiones que se encuentran a 300 msnm nivel del mar mientras que el presente estudio fue realizado en zonas que superan los 2.500 msnm.

Las condiciones ambientales a decir de autores como Baldrighi *et al.*, (2014); Ayala *et al.*, (2019), podrían estar generando un cambio en la fisiología ovárica, estos cambios podrían ser relacionados al número de folículos antrales reclutados en estos animales que están relacionados directamente con la producción de AMH como ya se describió anteriormente (Monniaux *et al.*, 2010). Por lo tanto, una menor cantidad de folículos pequeños en crecimiento se correlacionan con una menor concentración plasmática de AMH, esta relación es fortalecida por lo mencionado por Batista *et al.*, (2014) y Guerreiro *et al.*, (2014), quienes describen que la concentración de AMH varía mucho entre individuos de la misma raza y entre razas de ganado, considerando como patrón fundamental la población de folículos antrales.

## **5.2. Recuento de folículos antrales (RFA)**

La población media de folículos  $\geq 4\text{mm}$  determinado a través de ecografía transrectal en el día 11 del ciclo estral fue de  $17,03 \pm 0,61$  folículos esta población folicular se ubicó entre un número de 9 y 29 folículos (**Tabla 1**).

**Tabla 1:** Valores descriptivos de los niveles de hormona antimulleriana (AMH) y el recuento de folículos antrales (FRA) en vacas Holstein mestizas.

Variable	n	$\bar{X}$	Valores		Cuartiles			
			Mínimo	Máximo	25%	50%	75%	
(AMH ng/ml)	61	0,13± 0,11	0,11	0,03	0,40	0,05	0,09	0,25
(# RFA)	61	17,03 ±4,48		9,00	29,00	13,50	17,00	21,00
Condición Corporal	61	2,64± 0,26		2,25	3,00	2,50	2,50	3,00
Peso (kg)	61	394,9	15,4	350,0	425,0	389,0	398,0	403,0
Edad (meses)	61	19,95	1,38	17,00	24,00	19,00	20,00	21,00

N=muestra. X=valor medio. DE=desviación estándar.

En nuestro estudio, el valor medio de RFA obtenido fue de  $17,03 \pm 4,48$  folículos, estos valores son similares a los reportados por Mossa *et al.*, (2012), quienes encontraron una media de  $18,5 \pm 9,0$  folículos en vacas Holstein valoradas en diferentes épocas del año y criadas bajo un sistema de alimentación de pastoreo en Irlanda. Estos resultados son corroborados por Sartori *et al.*, (2016), quienes reportan una población media de folículos de  $12,7 \pm 5,8$ , rango de 5-40, en vacas Holstein y Nelore criadas bajo un sistema de alimentación intensivo de ración totalmente mezclada (TMR) en condiciones ambientales semitropicales.

Sin embargo, en otros trabajos realizados en vacas de genotipo lechero (Holstein) se establecen un RFA superior al determinado en la presente investigación, como el realizado por Gobikrushanth *et al.*, (2017), quienes establecieron una media  $23 \pm 1$  folículos en un rango 6-45 folículos, u otro trabajo realizado por Furukawa *et al.*,



(2020), quienes determinaron valores medios de  $27,2 \pm 12,2$  y un rango de 3,4-52,0 folículos.

Esta diferencia entre los valores del RFA podría ser explicados por los enunciados de Tovío, (2012) y Sartori *et al.*, (2016), quienes describieron que la alimentación y otros factores medioambientales pueden llegar a alterar la función ovárica y por ende el número de folículos antrales pequeños en crecimiento presentes en el momento del reinicio de la onda folicular. En este aspecto hay que considerar que la sierra del Ecuador es una zona templada ubicada sobre los 2.500 msnm, con varias formaciones agroecológicas, topografía accidentada, suelos erosionados con baja fertilidad (Malizia *et al.*, 2020). Donde existe alto grado de mestizaje (cruces) entre el ganado Criollo de la zona y la raza Hosltein (introducida), estos bovinos a través de los años han logrado cualidades notables, como un alto instinto materno; excepcional resistencia a enfermedades; elevada capacidad para aprovechar la escasa, dispersa y variada vegetación natural, como los rastrojos de los cultivos y una menor exigencia en la tecnificación de las condiciones de manejo existentes en las explotaciones de la zona (Aguirre *et al.*, 2011).

Estas características propias de la zona y la evidencia científica sobre cómo el vivir en regiones altas afecta negativamente algunas funciones corporales, como la reproductiva en humanos (Verratti & Di Giulio, 2012), o el grado de hipoxia hipobárica y el estrés oxidativo que sufren los ovinos en zonas altas, y cómo influye en el funcionamiento del eje Hipotálamo, hipófisis, ovarios, comprometiendo la foliculogénesis, crecimiento del cuerpo lúteo y la expresión de los genes IGF-I y IGF-II (Parraguez *et al.*, 2013), llegando a reducir la fertilidad de estos animales, situación diferente se ha observado en los ovinos que viven a nivel del mar (Parraguez & Gonzales, 2020).

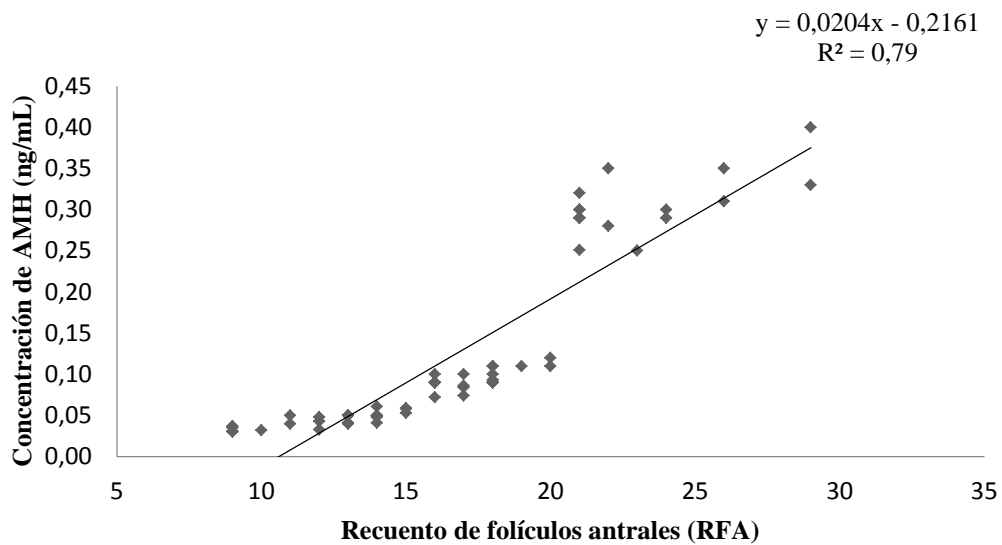


Esto sumado a las condiciones nutricionales propias de la zona, podrían alterar el medio metabólico y endócrino de la descendencia de estos bovinos (Santos *et al.*, 2008). En este contexto, estudios de epigenética (reprogramación) describen que el medio ambiente que rodea a la madre afecta al nuevo ser durante su vida fetal, ejerciendo profunda influencia en el desarrollo, y función fisiológica como la actividad del eje hipotálamo hipófisis ovarios, la producción de FSH, LH, así como el proceso de ovulación (Parraguez & Gonzales, 2020).

En la especie bovina se observó que las terneras nacidas de madres con restricción nutricional (60% del requerimiento nutricional materno, durante los primeros 110 días de gestación) mostraron recuento de folículos antrales (RFA) más bajos ( $15,8 \pm 1,8$  folículos), con niveles de AMH más bajos y mayores valores de FSH, *vs.* la descendencia de madres que consumieron el 120% del requerimiento nutricional (RFA= $23,6 \pm 1,9$ ) (Mossa *et al.*, 2013), lo cual podría alterar los niveles de AMH de estos animales en estas condiciones.

### **5.3. Relación entre el recuento de folículos antrales y los niveles plasmáticos de antimulleriana**

En nuestro estudio se determinó una relación entre los niveles plasmáticos de la AMH con el recuento total de folículos de  $\geq 4$ mm de tamaño ( $r= 0,89$ ;  $p<0,0001$ ). Además, el 79% de la variabilidad media del RFA podría ser explicado por el modelo de regresión lineal ajustada especificado en la **Fig. 8** ( $R^2=0,79$ ).



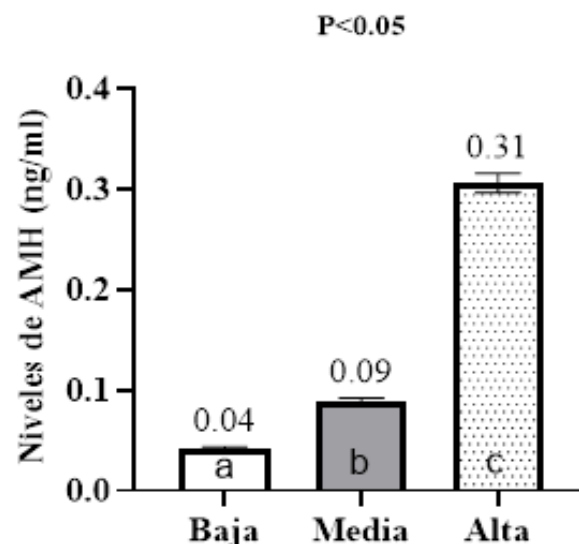
**Figura 8:** Representación de la asociación entre los niveles plasmáticos de la hormona Antimulleriana (AMH) con el recuento folículos antrales (RFA). Se muestra una línea de regresión lineal simple con su ecuación para facilitar la interpretación de los datos.

Rico *et al.*, (2009), establecieron una correlación entre el RFA y AMH de  $r=0,79$ ;  $p<0,001$ , similar a la establecida en esta investigación ( $r=0,89$ ;  $p<0,001$ ). Por otro lado, autores como Guerreiro *et al.*, (2014), describen la existencia de una asociación entre el RFA y la AMH ( $R^2=0,61$ ;  $p<0,001$ ), y por lo tanto, la cantidad de folículos antrales podrían ser predichos hasta en un 61% por la concentración plasmática de AMH. Esta asociación guarda concordancia con lo determinado en el presente estudio ( $R^2=0,79$ ;  $p<0,001$ ; **Fig. 8**). Por lo tanto, y a pesar de la diferencia en el valor máximo de la AMH; la relación y la asociación entre el RFA y los niveles de AMH mantienen similitud en los diferentes trabajos analizados, lo que nos permite pensar que se puede considerar la AMH como un biomarcador endocrino que determina la cantidad de folículos antrales.

Asimismo, cuando se valoró a los animales de nuestro estudio agrupadas en concordancia con la concentración de hormona Antimulleriana permitió establecer que el 31,1% ( $n=19$ ); el 42,6% ( $n=26$ ) y el 26,2% ( $n=16$ ) estos animales se encontraban en

el grupo bajo, medio y alto nivel plasmático de AMH respectivamente. Además, se observó diferencia estadística ( $P < 0,05$ ) entre la concentración media plasmática de AMH, en los grupos de bajo ( $0,04 \pm 0,001$  ng/mL); medio ( $0,09 \pm 0,003$  ng/mL); alto ( $0,31 \pm 0,009$  ng/mL), **Fig. 9**.

Al realizar el recuento de folículos antrales se observó que el grupo de alto nivel de AMH ( $23,3 \pm 0,71$ ), tenía mayor RFA respecto al grupo medio AMH ( $17,0 \pm 0,30$ ) y al grupo de bajo AMH ( $11,8 \pm 0,43$ ;  $P < 0,05$  para todos; **Fig. 10**).

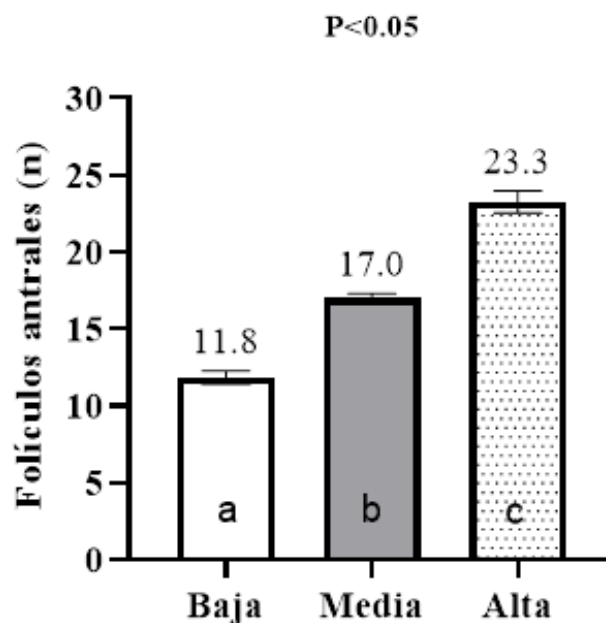


**Figura 9:** Valores medio y error estándar de la concentración plasmática de Hormona Antimulleriana en grupos de baja (blanco), media (gris) y alta (punteada). Diferentes literales indican diferencia estadística entre grupos ( $P < 0,01$ ).

La concentración media plasmática de AMH y número total de RFA en el presente trabajo fue menor al descrito por Guerreiro *et al.*, (2014), quienes agruparon las vaquillas en animales con alto y bajo nivel de AMH, determinando un valor medio de  $0,2 \pm 0,01$  ng/mL para el grupo de baja y  $0,4 \pm 0,02$  grupo de alta. Estos valores son similares a los establecidos por Baldrighi *et al.*, (2014), quienes describen valores de  $0,13 \pm 0,02$  ng/mL (baja);  $0,54 \pm 0,11$  ng/mL (alta). Una de las posibles explicaciones a



estas diferencias en la concentración de AMH, estaría dada por el número medio de folículos antrales encontrados en estos dos experimentos, así, Baldrighi *et al.*, (2014), establecieron un valor de  $24,1 \pm 1,3$  folículos (baja) y en el de alta  $68,5 \pm 17,5$  folículos; es decir el doble del RFA respecto a nuestro trabajo (**Fig. 10**) y como ya se mencionó con anterioridad la cantidad de folículos antrales se correlaciona positivamente con la concentración plasmática de AMH.



**Figura 10:** Valores medios y error estándar del recuento de folículos antrales (RFA), en los grupos de baja (blanco), media (gris) y alta (punteada) concentración de AMH. Diferentes literales indican diferencia estadística entre grupos ( $P < 0,01$ ).

#### 5.4. Relación entre la cantidad y calidad de COC's obtenidos por OPU

Un total de 450 folículos fueron aspirados en 30 sesiones de OPU de estos folículos se obtuvo 193 COC's, lo que permitió establecer un porcentaje de recuperación del 42,9% lo cual se encuentra por debajo del porcentaje (56,3%) descrito por Alvarado *et al.*, (2015), para ganado Holstein; así como de los trabajos de Ayala *et al.*, (2020), en ganado criollo ecuatoriano. Además, del 43,5 % ( $n=84$ ) de los COC's obtenidos fueron



de tipo A, el 32,1% (n=62) de tipo B, el 18,7% (n=36) de tipo C y el restante 5,7% (n=11) de tipo D. Del total COC's (193) recuperados, estos fueron clasificados en aptos (75,6%) y no aptos (24,4%) para la realización de PIV (**Tabla 2**). El porcentaje de COC's aptos y no aptos obtenidos en el presente trabajo difiere de los determinados por Alvarado *et al.*, (2015), quienes establecieron un 37% de COC's aptos y un 63% de no aptos, esta diferencia podría ser explicada el número de sesiones de OPU sucesivas realizadas en los dos trabajos y el tipo de sincronización utilizada.

**Tabla 2:** Respuesta ovárica de vaconas Holstein mestizas sometidas a la técnica de OPU sin estimulación ovárica (media  $\pm$  desviación estandar).

Variable	X (n = 30)		Valores	
			Mínimo	Máximo
<i>Folículos aspirados/sesión</i>	15,5	±4,99	5	26
<i>Ovocitos recuperados/sesión</i>	6,66	±2,81	2	12
<i>% de recuperación de COC's</i>	42,9			
<i>COC's Tipo A</i>	2,9	1,69	0	8
<i>COC's Tipo B</i>	2,1	1,38	0	5
<i>COC's Tipo C</i>	1,2	1,21	0	4
<i>COC's Tipo D</i>	0,4	0,73	0	3
<i>COC's Aptos (A+B)</i>	5,0	2,51	0	12
<i>COC's no Aptos (C+D)</i>	1,6	1,68	0	6

Se determinó un valor medio de AMH de  $0,04 \pm 0,001$  ng/ml (bajo) y  $0,28 \pm 0,001$  ng/ml (alto), (**Tabla 3**).

Las vaquillas que tuvieron un alto nivel de AMH proporcionaron un 41,38% más de folículos antrales de 5 y 8 mm, comparado con el grupo de bajo nivel de AMH ( $P < 0,001$ ; **Tabla 3**) en el día de la OPU. Además, el porcentaje de recuperación de



ovocitos fue mayor en el grupo de alto comparado con el de bajo nivel de AMH, (45,59% vs. 37,24%;  $P < 0,001$ ).

Esta particularidad observada en nuestro estudio, relacionado al grupo de alta concentración de AMH proporcionó mayor número de folículos antrales disponibles para la aspiración folicular ecoguiada (OPU), en comparación a los animales con baja concentración guarda relación con lo determinado por Vernunft *et al.*, (2015), quienes describen en su trabajo en vaquillas Holstein, realizado en Alemania, que el grupo de alta concentración proporciona  $11,9 \pm 2,0$  folículos vs. los  $7,7 \pm 0,6$  en el grupo de baja concentración. Estos dos trabajos concuerdan con el realizado por Guerreiro *et al.*, (2014), ellos observaron un 34,93% más de folículos antrales en las vaconas con alta concentración vs. las de baja concentración de AMH, al igual que el porcentaje de recuperación de ovocitos fue 17,1% más elevado en el grupo de alta concentración de AMH vs. los de baja.

**Tabla 3:** Valores medios y error estándar de los folículos aspirados y ovocitos recuperados en cada sesión mediante OPU, en los grupos de baja y alta concentración de AMH.

Variable	Baja (n=5)	Alta (n=5)	Valor P
AMH	0,04±0,001	0,28±0,001	<0,001
Folículos aspirados/sesión	11,15±0,83	19,06±0,76	<0,001
Ovocitos recuperados/sesión	4,15±0,32	8,69±0,49	<0,001
% de recuperación de COC's	37,24%	45,59%	<0,001

De la totalidad de COC's recuperados (n=193), en el grupo de alta concentración de AMH se obtuvieron el doble de COC's en comparación con el grupo de baja concentración de AMH (**Tabla 3**).



Al clasificar el total de COC's obtenidos (n=193) en tipo A; B; C y D, se determinó que los de tipo A fueron el doble en el grupo de alta vs. los de baja ( $3,75 \pm 0,36$  vs.  $1,85 \pm 0,39$ ;  $p < 0,001$ ). Sin embargo, el valor medio de COC's de tipos C fueron similares entre sí ( $1,50 \pm 0,35$  vs.  $0,92 \pm 0,24$ ;  $p > 0,05$ ).

Además, al agrupar el total de COC's obtenidos en ovocitos aptos y no aptos para la producción de embriones *in vitro*, se estableció la existencia del doble de COC's aptos en el grupo de alta concentración de AMH en comparación con el de baja concentración ( $6,69 \pm 0,49$  vs.  $3,00 \pm 0,38$ ;  $< 0,001$ ). Pero esto no sucedió con los no aptos, mismos que fueron similares en los dos grupos (**Tabla 4**).

El número y la calidad de COC's obtenidos en cada uno de los grupos (alta y baja) del presente trabajo son similares a los descritos por Guerreiro *et al.*, (2014), en su trabajo en vaquillas Holstein durante sesiones repetidas de OPU, así ellos determinaron que el grupo de alta concentración de AMH proporcionaba el doble de COC's aptos para el cultivo *in vitro*.

**Tabla 4:** Valores medios y error estándar del tipo de COC's obtenidos en cada sesión mediante OPU, en los grupos de baja (n=5) y alta (n=5) concentración de AMH.

Parámetro	Baja	Alta	P
<i>Ovocitos recuperados/sesión</i>	4,15±0,32	8,69±0,49	<0,001
<i>COC's Tipo A</i>	1,85±0,39	3,75±0,36	<0,001
<i>COC's Tipo B</i>	1,15±0,24	1,93±0,29	<0,001
<i>COC's Tipo C</i>	0,92±0,24	1,50±0,35	>0,05
<i>COC's Tipo D</i>	0,23±0,12	0,50±0,22	>0,05
<i>COC's Aptos (A+B)</i>	3,00±0,38	6,69±0,49	<0,001
<i>COC's no Aptos (C+D)</i>	1,15±0,29	2,00±0,50	>0,05



## 6. CONCLUSIONES

La concentración mínima de hormona Antimulleriana encontrada en el total de vaquillas en estudio fue similar al descrito en otros trabajos a nivel internacional, no obstante, el valor máximo difiere. Sin embargo, los niveles de AMH si guardan relación con la cantidad y calidad de ovocitos recuperados por OPU.

Los niveles de AMH se relacionan fuertemente con el recuento de folículos antrales, por lo tanto, se puede considerar a la AMH como un biomarcador endócrino confiable del número de folículos antrales existentes al momento del reinicio de la onda folicular.

Los animales con alta concentración de AMH proporcionan el doble de folículos antrales a ser aspirados en la OPU; además el porcentaje de recuperación es mayor y se obtienen el doble de COC's aptos para la producción de embriones *in vitro* en comparación con el grupo de baja concentración de AMH.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2012). Técnicas de laboratorio usadas con frecuencia en inmunología. In *Inmunología celular y molecular* (7th ed., pp. 513–514).
- Abdel Aziz, R. L., Khalil, A. A. Y., Abdel-Wahab, A., Hassan, N. Y., Abdel-Hamied, E., & Kasimanickam, R. K. (2017). Relationship among circulating anti-Müllerian hormone, insulin like growth factor 1, cadmium and superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology*, *100*(3), 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.06.007>
- Aguirre, L., Bermeo, A., Maza, D., & Merino, L. (2011). Estudio fenotípico y zoométrico del bovino criollo de la sierra media y alta de la región sur del Ecuador (RSE). *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA*, *1*, 392–396. Retrieved from [http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo\\_110\\_lin\\_photo/articulos/2011/Aguirre2011\\_1\\_392\\_396.pdf](http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo_110_lin_photo/articulos/2011/Aguirre2011_1_392_396.pdf)
- Alcívar, E., & Arteaga, M. (2019). Evaluación de los niveles de hormona antimülleriana sobre la dinámica folicular en vaquillas Brahman (Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López). Retrieved from <http://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1055/1/TTMAI5.pdf>
- Alvarado, A., Gamarra, G., Gallegos, A., & Samillán, V. (2015). Tasa de recuperación de ovocitos en vacas holstein en descarte. *Anales Científicos*, *77*(1), 63–68. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.21704/ac.v77i1.545>
- Alvarado, J. (2017). Evaluación de la calidad de ovocitos provenientes de vacas criollas y ovarios de matadero (Universidad de Cuenca). Retrieved from <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26216/1/Tesis.pdf.pdf>
- Argudo, D., Quezada, A., Mocha, A., Soria, M., Méndez, S., Ayala, L., ... Perea, F. (2018). Efecto de la presión de vacío sobre las características morfológicas de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, *26*, 2018. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/30556/1/documento.pdf>



- Ayala, L.E.1; Pesantez, J.L1; Rodas, E.R.1; Dután, J.B.1; Calle, G.R.1; Murillo, Y.A.1; Vázquez, J.M.1; Nieto, P.E.1; Ortega, V. V., & y Samaniego, J. X. 2. (2019). Dinámica folicular de vaquillas Criollas al pastoreo en el altiplano ecuatoriano. *Archivos de Zootecnia, jorj*.
- Ayala Guanga, L., Samaniego Campoverde, J., Argudo Garzón, D., Perea Brugal, M., Perea Ganchou, F., Rodas Carpio, E., & Nieto Escandón, P. (2020). El intervalo de tiempo entre la estimulación ovárica con FSH/LH y la colecta afecta la cantidad, calidad y capacidad de desarrollo de los ovocitos recuperados de novillas criollas ecuatorianas. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú, 31(1)*, e17571. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i1.17571>
- Baldrighi, J., Sá Filho, M. F., Batista, E. O. S., Lopes, R. N. V. R., Visintin, J. A., Baruselli, P. S., & Assumpção, M. E. O. A. (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 = Zuchthygiene, 49(6)*, 1015–1020. <https://doi.org/10.1111/rda.12430>
- Baruselli, P. S., Batista, E. O. S., Vieira, L. M., Ferreira, R. M., Guerreiro, B. G., Bayeux, B. M., ... Gimenes, L. U. (2016). Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: Effects of different developmental & reproductive stages. *Animal Reproduction, 13(3)*, 264–272. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR861>
- Baruselli, P., Santana, E., Viera, L., & Souza, A. . (2015). Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. *Anim. Reprod, 12(3)*, 487–497. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/281240962\\_Relationship\\_between\\_follicle\\_population\\_AMH\\_concentration\\_and\\_fertility\\_in\\_cattle](https://www.researchgate.net/publication/281240962_Relationship_between_follicle_population_AMH_concentration_and_fertility_in_cattle)
- Batista, E. O. S., Macedo, G. G., Sala, R. V., Ortolan, M. D. D. V., Sá Filho, M. F., Del Valle, T. A., ... Baruselli, P. S. (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>



- Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (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>
- Bols, P. E. J., Leroy, J. L. M. R., Vanholder, T., & Van Soom, A. (2004). A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. *Theriogenology*, 62(5), 906–914. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.016>
- Boni, R. (2012). Ovum pick-up in cattle: A 25 year retrospective analysis. *ResearchGate*, 362–369. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/297517475\\_Ovum\\_pick-up\\_in\\_cattle\\_A\\_25\\_year\\_retrospective\\_analysis](https://www.researchgate.net/publication/297517475_Ovum_pick-up_in_cattle_A_25_year_retrospective_analysis)
- Cabrer, M. (2019). *L'hormona antimülleriana (AMH): Una mesura del potencial reproductiu en espècies domèstiques* (Universitat de Lleida). Retrieved from <https://repositori.udl.cat/bitstream/handle/10459.1/68033/mmcabrera.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Céliz, R. (2017). *Determinación de la reserva ovárica en alpacas mediante la concentración de la hormona antimulleriana (AMH) en el plasma sanguíneo* (Universidad Nacional Agraria la Molina). Retrieved from <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3077/L53-C4-T-resumen.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Chaubal, S., Molina, J., Ohlrichs, C., Ferre, L., Faber, D., Bols, P., ... Yang, X. (2006). Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology*, 65(8), 1631–1648. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.07.020>
- de Loos, F., van Vliet, C., van Maurik, P., & Kruip, T. A. M. (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research*, 24(2), 197–204. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120240207>
- Espin, P. (2018). *Maduración de ovocitos bovinos con dos métodos de maduración* (Universidad Politécnica Salesiana). Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16502/1/UPS-CT007995.pdf>





- Estrella, C., & Suconota, A. (2018). *Viabilidad y morfología de ovocitos bovinos de ovarios de matadero de acuerdo al diámetro folicular* (Universidad de Cuenca). Retrieved from [http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/30082/1/Trabajo de titulacion.pdf](http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/30082/1/Trabajo_de_titulacion.pdf)
- Fernández, A., Díaz, T., & Muñoz, G. (2007). Producción in vitro de embriones bovinos. *Revista de La Facultad de Ciencias Veterinarias*, 48(1), 51–60.
- Furukawa, E., Masaki, T., Sakaguchi, K., Bo, M., Yanagawa, Y., Ueda, K., & Nagano, M. (2020). Relationship between the timing of the first postpartum ovulation and antral follicle counts in Holstein cows. *Journal of Ovarian Research*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-0610-5>
- 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>
- Gañan, S., & Londa, K. (2020). *Relación entre Niveles de Hormona Antimülleriana y recuento de folículos antrales en vaquillas Holstein mestizas pre y pos faenamiento* (Universidad de Cuenca). Retrieved from [http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/34988/1/Trabajo de titulacion.pdf](http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/34988/1/Trabajo_de_titulacion.pdf)
- Ginther, O. J. (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. A., Bruinjé, T. C., Colazo, M. G., Butler, S. T., & Ambrose, D. J. (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>
- Gonella, Á., Atuesta, J., Bernal, S., & Chacón, L. (2013). Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4(1), 65. <https://doi.org/10.22490/21456453.1967>



- Guerreiro, B. M., Batista, E. O. S., Vieira, L. M., Sá Filho, M. F., Rodrigues, C. A., Castro Netto, A., ... Baruselli, P. S. (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>
- Ireland, J. J. A., Smith, G. W. B., Scheetz, D. A., & Folger, J. K. 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-Mu'llerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve i.* 23(2), 1–14. <https://doi.org/10.1071/RD10226>
- Ireland, J. J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J. L. H., Smith, G. W., Lonergan, P., & Evans, A. C. O. (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>
- López, A. (2017). *Factores asociados a la obtención de ovocitos para FIV (Fertilización in vitro) por medio de la técnica de OPU (Ovum pick up) en ganado Bos Taurus* (Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro). Retrieved from [http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/42591/ARTURO\\_ALEXIS\\_LOPEZ\\_MARRUFO.pdf?sequence=1](http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/42591/ARTURO_ALEXIS_LOPEZ_MARRUFO.pdf?sequence=1)
- Malizia, A., Blundo, C., Carilla, J., Acosta, O., Cuesta, F., Duque, A., ... Young, K. (2020). Elevation and latitude drives structure and tree species composition in Andean forests: Results from a large-scale plot network Agustina. *PLOS ONE*, 15(4), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231553>
- Monniaux, D., Rico, C., Larroque, H., Dalbiès-Tran, R., Médigue, C., Clément, F., & Fabre, S. (2010). L'hormone antimüllérienne, prédicteur endocrinien de la réponse une stimulation ovarienne chez les bovins. *Gynecologie Obstetrique et Fertilité*, 38(7–8), 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2010.05.009>
- Mossa, F., Walsh, S. W., Butler, S. T., Berry, D. P., Carter, F., Lonergan, P., ... Evans, A. C. O. (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>
- Mossa, Francesca, Carter, F., Walsh, S. W., Kenny, D. A., Smith, G. W., Janet, L. H., ... Evans, A. C. O. (2013). Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. *Biology of Reproduction*, 88(4), 1–9. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.107235>
- Nabenishi, H., Kitahara, G., Takagi, S., Yamazaki, A., & Osawa, T. (2017). Relationship between plasma anti-Müllerian hormone concentrations during the rearing period and subsequent embryo productivity in Japanese black cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 60, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2017.01.002>
- Ongaratto, F. (2013). *Control del desarrollo folicular para la obtención de COCS por aspiración guiada por ultrasonografía* (Universidad Nacional de Córdoba). Retrieved from [http://iracbiogen.com/admin/biblioteca/documentos/Tesis\\_Felipe\\_ongaratto.pdf](http://iracbiogen.com/admin/biblioteca/documentos/Tesis_Felipe_ongaratto.pdf)
- Parraguez, Victor, & Gonzales, A. (2020). Endocrinology of reproductive function and pregnancy at high altitudes. *Endocrine and Metabolic Research*, 11(27), 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.12.006>
- Parraguez, Víctor, Urquieta, B., Pérez, L., Castellaro, G., Reyes, M., Torres, L., ... González, A. (2013). Fertility in a high-altitude environment is compromised by luteal dysfunction: the relative roles of hypoxia and oxidative stress. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(24), 1–12. Retrieved from <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-11-24>
- Peláez, V. (2011). *Producción in vitro de embriones bovinos* (Universidad de Cuenca). Retrieved from <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3053/1/mv170.pdf>
- Perry, G. A., & Cushman, R. A. (2016). Invited Review: Use of ultrasonography to make reproductive management decisions. *Professional Animal Scientist*, 32(2), 154–161. <https://doi.org/10.15232/pas.2015-01446>



- Pieterse, M. C., Kappen, K. A., Kruip, T. A. M., & Taverne, M. A. M. (1988). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30(4), 751–762. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90310-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90310-X)
- Quintana, M., Campos, P., Herrera, P., Gallego, C., & Padrón, E. (2012). Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros para fertilización in vitro FIV obtenidos de hembras Bubalus Bubalis enviadas a matadero. *Revista de Salud Animal*, 34(1), 53–56. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v34n1/rsa08112.pdf>
- Ramírez, O., & Jiménez, C. (2010). Recolección de oocitos para procedimientos in vitro en Bovinos. *Revista Acovez*, 24(1), 1–3. Retrieved from [https://encolombia.com/veterinaria/publi/acovez/ac241/acovez24\\_recoleccion4/](https://encolombia.com/veterinaria/publi/acovez/ac241/acovez24_recoleccion4/)
- Ricárdez, M. (2015). *Efectos de la hormona antimulleriana (AMH) en bovinos* (Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro). Retrieved from [http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7793/MATH\\_US RICARDEZ MARTINEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7793/MATH_US RICARDEZ MARTINEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Rico, C., Fabre, S., Medigue, C., Clemente, N. d., Clement, F., Bontoux, M., ... Monniaux, D. (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, Charlne, Drouilhet, L., Salvetti, P., Dalbis-Tran, R., Jarrier, P., Touz, J. L., ... Monniaux, D. (2012). Determination of anti-Mullerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: From the laboratory to the farm. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(7), 932–944. <https://doi.org/10.1071/RD11290>
- Romero, J. (2019). *Producción de embriones in vitro con ovocitos obtenidos con tres protocolos de estimulación ovárica y aspirados por ovum pick up en vacas Holstein mestizas* (Universidad de Cuenca). Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/32174/1/TRABAJO-DE->



TITULACION.pdf

- Ruiz, S., Romero-Aguirregomez, J., Astiz, S., Peinado, B., Almela, L., & Poto, A. (2013). Application of reproductive biotechnology for the recovery of endangered breeds: Birth of the first calf of murciana-levantina bovine breed derived by opu, in vitro production and embryo vitrification. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(6). <https://doi.org/10.1111/rda.12179>
- Sakaguchi, K., Yanagawa, Y., Yoshioka, K., Suda, T., Katagiri, S., & Nagano, M. (2019). Relationships between the antral follicle count, steroidogenesis, and secretion of follicle-stimulating hormone and anti-Müllerian hormone during follicular growth in cattle. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0534-3>
- Samaniego, J. (2017). *Evaluación de ovocitos recuperados por Ovum Pick Up (OPU) en tiempos diferentes, luego de la estimulación ovárica con FSH-LH (Pluset®) en vaquillas Criollas* (Universidad de Cuenca). Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/27820/1/Trabajo de Titulación.pdf>
- Santi, C. (2018). *Aspiración folicular guiada mediante la ultrasonografía con el transductor endovaginal humano, para la colección de ovocitos en vacas Brown Swiss en altura* (Universidad Nacional del Altiplano). Retrieved from [http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/11287/Santi\\_Quispe\\_Ludio\\_Carol.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/11287/Santi_Quispe_Ludio_Carol.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Santos, J. E., Cerri, R. L., & Sartori, R. (2008). Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology*, 69(1), 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.010>
- Sarmiento, S., & Naulaguari, L. (2019). *Valoración de ovocitos obtenidos mediante Ovum pick-up en vaquillas sometidas a protocolos alternativos de sincronización de la onda folicular y estimuladas con FSH-LH* (Universidad de Cuenca). Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/31787/1/Trabajo-de-titulación.pdf>



- Sartori, R., Gimenes, L. U., Monteiro, P. L. J., Melo, L. F., Baruselli, P. S., & Bastos, M. R. (2016). Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology*, 86(1), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.016>
- Silva, K. C., Santos, G. M. G. dos, Siloto, L. S., Santos, J. T. dos, Oliveira, E. R. de, Machado, F. Z., ... Seneda, M. M. (2014). The correlation between the number of antral follicles and ovarian reserves (preantral follicles) in purebred *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *Animal Reproduction Science*, 151(3–4), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.10.016>
- Singh, J., Domínguez, M., Jaiswal, R., & Adams, G. P. (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>
- Solís, A., Guerra, R., Sandoya, G., & De Armas, R. (2012). Efecto de sincronización de la onda folicular y de la frecuencia de aspiración de folículos en novillas de la raza Brahman. *REDVET*, 13(10), 2–16. Retrieved from <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet2012Volumen13Nº10->  
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101012.html>
- Song, X., Bokkers, E. A. M., van Mourik, S., Groot Koerkamp, P. W. G., & van der Tol, P. P. J. (2019). Automated body condition scoring of dairy cows using 3-dimensional feature extraction from multiple body regions. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 4294–4308. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15238>
- Souza, A. H., Carvalho, P. D., Rozner, A. E., Vieira, L. M., Hackbart, K. S., Bender, R. W., ... Wiltbank, M. C. (2015). Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(1), 169–178. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8182>
- Tovío, N. (2012). Factores relacionados con la dinámica folicular en la hembra bovina 1 Factors Associated with Follicular Dynamics in Female Bovines. *Revista Spei Domus*, 8(17), 38–47.
- Vásquez, J. (2016). *Tasa de recuperación de ovocitos por ovum pick up en vacas*



*Holstein con administración de propilenglicol en su dieta en la Universidad Nacional Agraria* (Universidad Nacional del Centro del Perú). Retrieved from <http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/3382/VasquezMantari.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Vernunft, A., Schwerhoff, M., Viergutz, T., Diederich, M., & Kuwer, A. (2015). Anti-Muellerian hormone levels in plasma of Holstein-Friesian heifers as a predictive parameter for ovum pick-up and embryo production outcomes. *Journal of Reproduction and Development*, 61(1), 74–79.
- Verratti, V., & Di Giulio, C. (2012). High-altitude hypoxia and reproduction: is there an environmental limit to the human male reproductive system? *Sport Sci Health*, 39–40. <https://doi.org/10.1007/s11332-012-0110-0>

## 8. ANEXOS

### Anexo 1: Materiales y herramientas para protocolo de sincronización



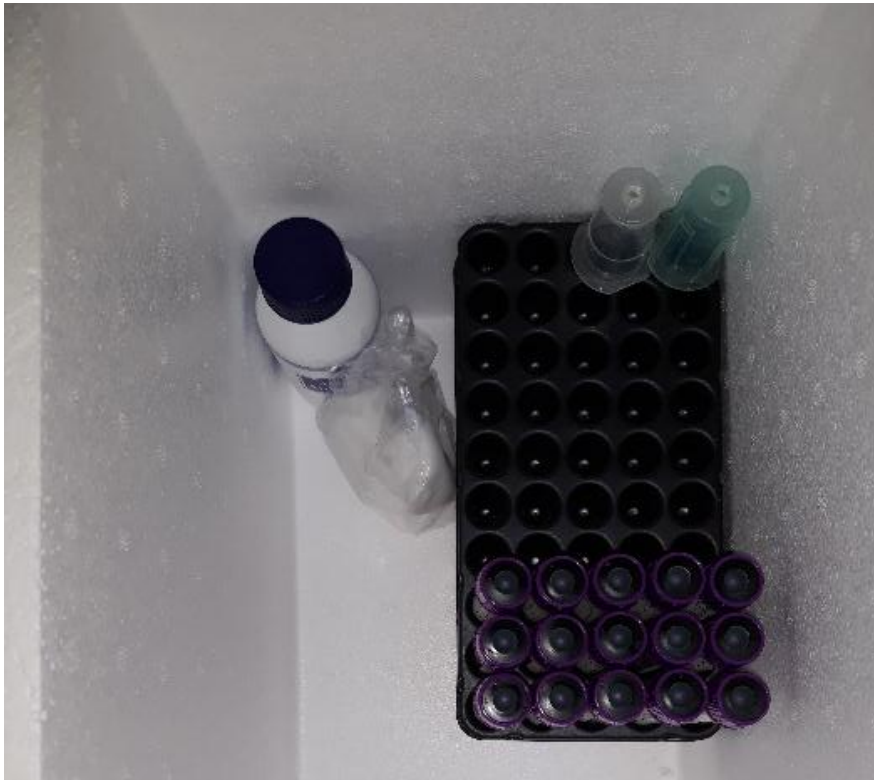


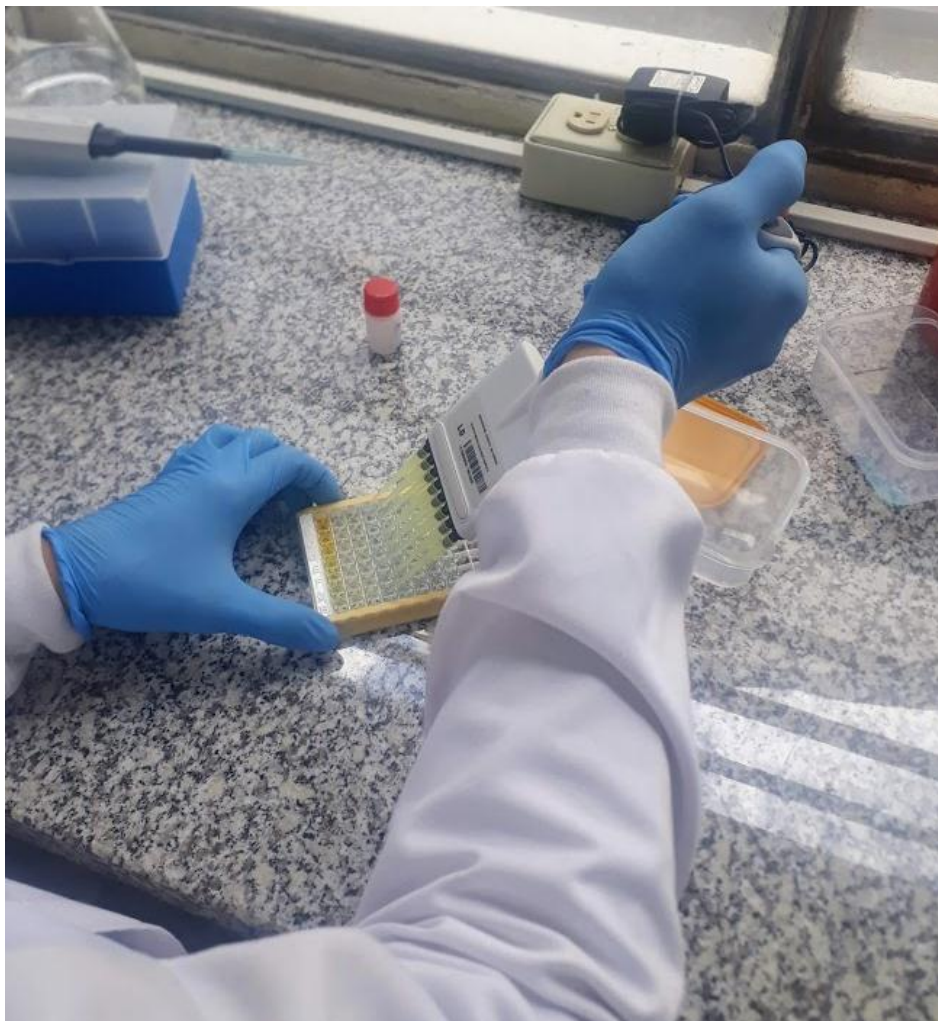


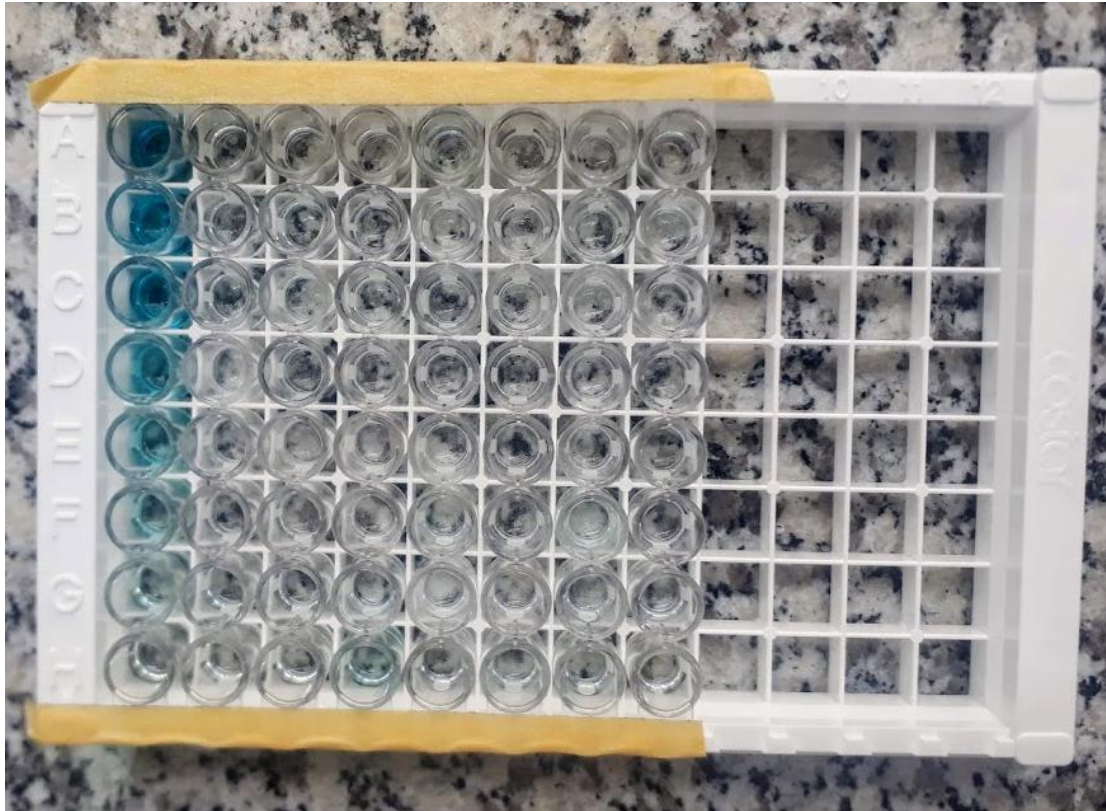
**Anexo 2: Plantilla de registro del recuento de folicular**

<b>PROPIETARIO</b>	<b>TOTAL DE ANIMALES</b>	<b>CC</b>	<b>IDENTIFICACIÓN (ARETE)</b>	<b>FECHA DE NACIMIENTO</b>	<b>FECHA INICIO</b>	<b>FECHA RECuento</b>	<b>OVARIO DERECHO(FL)</b>	<b>OVARIO IZQUIERDO(FL)</b>	<b>OBSERVACIONES</b>

### Anexo 3: Materiales y equipos utilizados para el análisis de la AMH









Software Version 3.03.14

Experiment File Path: C:\Users\usuario\Documents\MEGA\01- Antonio J. Vallecillo\ELISA - Luis Ayala\Experiment1 .xpt  
 Protocol File Path: C:\Users\usuario\Documents\MEGA\01- Antonio J. Vallecillo\ELISA - Luis Ayala\Protocol1 prt

Plate Number: Plate 2  
 Date: 17/2/2020  
 Time: 15:25:30  
 Reader Type: Epoch  
 Reader Serial Number: 17110611  
 Reading Type: Reader

Procedure Details

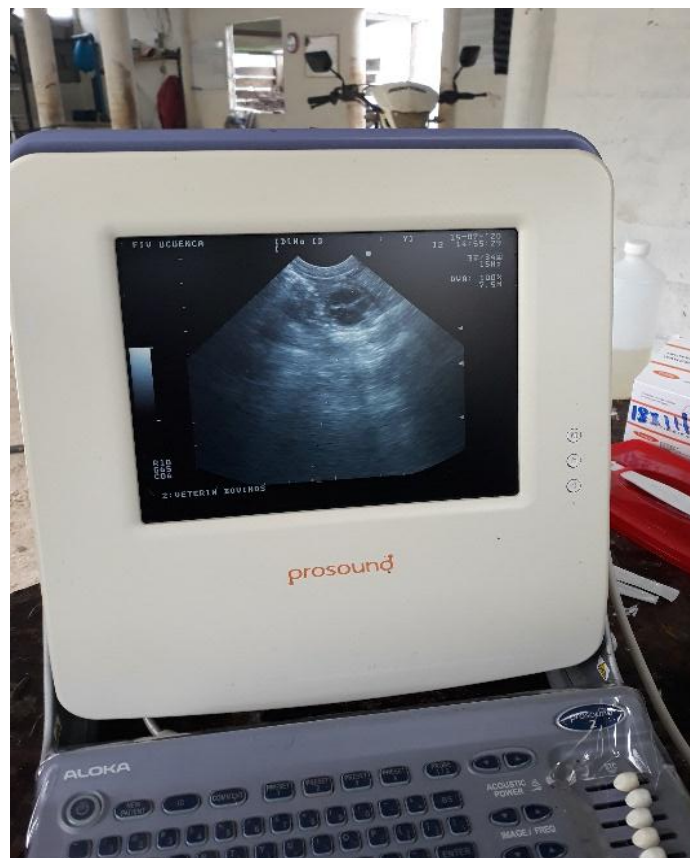
Plate Type: 96 WELL PLATE  
 Eject plate on completion  
 Read: Absorbance Endpoint  
 Full Plate  
 Wavelengths: 450  
 Read Speed: Normal, Delay: 100 msec, Measurements/Data Point: 8

Actual Temperature: 0.0

Results

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	3.404	0,083	0,081	0,081	0,146	0,079	0,100	0,090	0,000	0,000	0,000	0,000	450
B	2.388	0,089	0,149	0,083	0,095	0,082	0,128	0,105	0,000	0,000	0,000	0,000	450
C	1.605	0,106	0,109	0,097	0,105	0,090	0,099	0,089	0,000	0,000	0,000	0,000	450
D	0.932	0,070	0,113	0,090	0,099	0,084	0,095	0,082	0,000	0,000	0,000	0,000	450
E	0.571	0,079	0,077	0,075	0,098	0,081	0,095	0,095	0,000	0,000	0,000	0,000	450
F	0.326	0,077	0,097	0,079	0,119	0,090	0,174	0,096	0,000	0,000	0,000	0,000	450
G	0.226	0,125	0,094	0,135	0,100	0,083	0,123	0,113	0,000	0,000	0,000	0,000	450
H	0.122	0,099	0,083	0,244	0,107	0,141	0,128	0,102	0,000	0,000	0,000	0,000	450

#### Anexo 4: Procedimiento de las sesiones de OPU



**Anexo 5: Valoración de los ovocitos recuperados mediante OPU**





