

9-2019

Estandarización de la detección de la hormona anti-mulleriana en hembras donantes de la raza Brahmán

Andrés Felipe Ramírez Rodríguez
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria



Part of the [Veterinary Medicine Commons](#)

Citación recomendada

Ramírez Rodríguez, A. F. (2019). Estandarización de la detección de la hormona anti-mulleriana en hembras donantes de la raza Brahmán. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/501

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Medicina Veterinaria by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

ESTANDARIZACIÓN DE LA DETECCIÓN DE LA HORMONA ANTI-MULLERIANA EN HEMBRAS DONANTES DE LA RAZA BRAHMAN

ANDRÉS FELIPE RAMÍREZ RODRÍGUEZ



UNIVERSIDAD DE LA SALLE
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
BOGOTÁ D.C., SEPTIEMBRE DEL AÑO 2019

ESTANDARIZACIÓN DE LA DETECCIÓN DE LA HORMONA ANTI-MULLERIANA EN HEMBRAS DONANTES DE LA RAZA BRAHMAN

ANDRÉS FELIPE RAMÍREZ RODRÍGUEZ
14142022

Tutora:

DRA. CAROLINA BESPALHOK JACOMETO



UNIVERSIDAD DE LA SALLE
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
BOGOTÁ D.C., SEPTIEMBRE DEL AÑO 2019

Tabla de Contenido

Capítulo 1. Generalidades del proyecto

1.1 Título

1.2 Resumen

1.3 Planteamiento del problema

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

1.4.2 Objetivos específicos

1.5 Marco teórico y/o estado del arte

1.6 Metodología

1.6.1 Descripción del uso de animales, de cadáveres, de recursos naturales o del trabajo con comunidades

1.6.2 Situación geográfica

1.6.3 Enfoque de investigación

1.6.4 Variables

1.6.5 Métodos

1.7 Resultados

1.8 Discusión

1.9 Conclusiones

1.10 Referencias Bibliográficas

1.11 Lista de Anexos

Capítulo 1. Generalidades del proyecto

1.1 Título

Estandarización de la detección de la hormona anti-Mulleriana en hembras donantes de la raza Brahman

1.2 Resumen

Ante la creciente demanda de proteína de origen animal por parte de la población global, la implementación de biotecnologías de la reproducción surge como una herramienta estratégica para aumentar la eficiencia en la producción animal y poder satisfacer tal demanda. La hormona anti-mulleriana (AMH) se ha demostrado estar estrechamente relacionada con la reserva ovárica de las hembras y el número de oocitos que pueden ser aspirados, con el fin de llevar a cabo fertilización *in vitro* de los mismos. Este marcador biológico de fertilidad permite predecir el número de oocitos que se encuentran en fase de crecimiento al interior de los ovarios de los bovinos, contando con la ventaja respecto a otros marcadores y estrategias de medición de fertilidad, que su concentración se encuentra estable a lo largo de todo el ciclo estral, razón por la cual cualquier hembra podrá ser medida en cualquier fase del ciclo estral en que se encuentre. A pesar de los avances que se han realizado en la implementación de esta técnica, no se cuenta con registros en la raza Brahman, la cual es ampliamente utilizada en el trópico colombiano y en la cual, en gran medida, se implementan varias de las biotecnologías para potenciar el potencial reproductivo de la raza. El objetivo de este estudio es estandarizar la prueba de detección para la AMH con el fin de conocer los rangos en los cuales se espera encontrar la hormona en el plasma de bovinos de raza Brahman. Para esto se tomarán muestras de sangre de vacas de la hacienda Buenos Aires (Purificación, Tolima) en diferentes días del ciclo estral y para el análisis de la hormona se utilizará un kit de ELISA comercial.

1.3 Planteamiento del problema

Para el desarrollo de la ganadería bovina colombiana, en especial la de carne, es conveniente hacer mejoramiento genético para características de importancia económica. Una herramienta que ayuda en este proceso es la aplicación de biotecnologías reproductivas, dentro de estas la producción de embriones *in vitro*, siendo que maximiza el uso de las hembras con mayor potencial. Por lo anterior, para incrementar el número de crías mejoradas es importante la detección de las hembras con mayor reserva ovárica y en Colombia no se tiene estandarizada una prueba hormonal que permita medir esta reserva, directa o indirectamente.

1.4 Objetivos

1.4.1 Determinar los niveles séricos de la hormona anti-mulleriana (AMH) en vacas Brahman en diferentes días del ciclo estral.

1.4.2 Objetivos específicos

- Validar la prueba inmunoenzimática de detección en sangre de la AMH, estableciendo los coeficientes de variación intra e interensayo para las hembras bovinas donantes de raza Brahman.
- Determinar si se presentan diferencias en la concentración de la AMH en los diferentes días del ciclo estral de hembras bovinas Brahman.

1.5 Marco teórico

La hormona antimulleriana (AMH) es una hormona glicoproteica esencial durante la fase fetal para el proceso de diferenciación sexual del macho. En la hembra se secreta por las células de la granulosa de folículos antrales pequeños (Baldrighi et al., 2014). La AMH se considera un

marcador de importancia para evaluar la reserva ovárica de las hembras. En la vida adulta se expresa en la foliculogénesis durante el proceso de reclutamiento y selección, de igual modo se ha demostrado que luego de la fase de reclutamiento, tiene la función de regular el crecimiento de los folículos al alterar su nivel de respuesta a la hormona folículo estimulante (FSH) (Durlinger et al., 1999).

La AMH se puede detectar mediante un inmunoensayo con anticuerpos específicos para la AMH en las especies bovina, ovina y caprina; ya que la sensibilidad de la prueba para humanos aplicada en estas especies era muy baja, capaz de detectar la hormona con límites de detección tan bajos como 0,4 ng/ml con una sensibilidad de 1,4 ng/ml (Arce et al., 2014).

Los niveles séricos de la AMH están correlacionados negativamente con la edad, por lo que sirve como indicador de reserva ovárica. En becerras normales y ciclo estral sin presentación de condiciones patológicas se detectó una mayor cantidad de AMH respecto a hembras que ya estaban ciclando, lo anterior independientemente a la aplicación o no de FSH, por lo que se comprobó que los niveles de la hormona están más relacionados al número de folículos (Batista et al., 2014).

Adicionalmente, debido a que la expresión de la AMH se da también en folículos pequeños en estado de crecimiento, se espera que los niveles séricos de esta hormona sean constantes durante todas las fases del ciclo estral en bovinos. Existe una relación directa entre los niveles séricos de AMH y el número de embriones recuperados luego de un tratamiento de superovulación (Arouche et al., 2015).

En otro estudio se demostró que la concentración de AMH en plasma y el número de embriones colectados y considerados transferibles están estrechamente relacionados (Monniaux et al., 2010). Adicionalmente el tratamiento para sincronizar las hembras bovinas no afecta la

concentración de la AMH comparadas con las que se encuentran en su ciclo estral normal (Pfeiffer, Jury, & Larson, 2014).

En otro estudio se evaluaron los factores que determinan y regulan la producción de AMH por parte de la vaca, llegando a la conclusión que a nivel folicular la expresión de AMH es dependiente de la etapa en la cual se encuentre el folículo, siendo las vacas que tuvieron mayor respuesta a un tratamiento superovulatorio aquellas que tuvieron mayores concentraciones de AMH a lo largo del ciclo estral (Visser, Jong, Laven, & Themmen, 2006).

A lo largo del ciclo estral, el comportamiento de la concentración sérica de la AMH es independiente respecto a las ondas foliculares. De igual modo se concluyó que los mejores momentos para muestrear las vacas, y que su resultado fuera más representativo respecto a su capacidad de producir embriones, fue en el estro y al día 12 del ciclo (Rico et al., 2009, 2011).

La AMH constituye un marcador cuantitativo de reserva ovárica, actualmente ya está siendo usada esta técnica en humanos, y se ha demostrado que los niveles séricos de esta hormona observados en mujeres en cualquier fase del ciclo menstrual no muestran variación. Adicionalmente se logró establecer una relación entre los niveles de AMH y el desarrollo de senos en la fase de la pubertad en mujeres, lo cual es una manifestación del efecto de las gonadotropinas y función esteroidea, ratificando de ese modo su rol como marcador de función ovárica en mujeres jóvenes (Abdel Hafez et al., 2018).

La viabilidad de la AMH como marcador diagnóstico y pronóstico en mujeres de la función ovárica está regulada por la expresión de 2 miRNA (miR-181 y miR-181b), encargados del señalamiento de la FSH y crecimiento folicular, los cuales se ha demostrado tener un efecto directo sobre la expresión de genes y foliculogénesis, al observar que altos niveles de AMH en

el suero sanguíneo previo al tratamiento de superovulación mejora el rendimiento de los oocitos (Hayes et al., 2016).

Se ha demostrado que los niveles de AMH en suero predicen mejor la calidad de los oocitos en relación al fluido folicular, esto pudo concluirse a partir de la comparación entre el número de oocitos maduros y su integridad morfológica y los niveles de AMH medidos en ambos fluidos, por ende, la AMH sérica se considera el mejor indicador para predecir la calidad de los oocitos (Wiweko et al., 2016).

Nuevamente, en otro estudio, se obtuvieron los mismos resultados, existiendo una alta correlación entre la AMH y mayor promedio de embriones por vaca después de tratamiento para superovulación (Arouche et al., 2015).

En cuanto a experimentos realizados en bovinos se obtuvieron resultados similares, siendo las vacas con mayores concentraciones de AMH en suero son las que produjeron un mayor número de embriones luego de un tratamiento superovulatorio empleando FSH. A pesar de la funcionalidad de esta prueba para predecir este importante parámetro reproductivo, anteriormente no se contaba con un ELISA específico para bovinos, por lo que se usaba una prueba para humanos, sin embargo, actualmente se cuenta con inmunoensayos específicos para bovinos, ovinos y caprinos (BOC ELISA). Esta prueba cuenta con AMH recombinante bovina, usando anticuerpos específicos contra la AMH bovina, dando un coeficiente de variación intraensayo entre 3,4-11,3% para concentraciones de AMH entre 23,68 y 1,74 ng/ml, con un coeficiente de variación interensayo entre 4,8-20,5% para concentraciones entre 25,53-1,42 ng/ml, siendo su límite de detección 0,4 ng/ml con una sensibilidad funcional de 1,4 ng/ml.

Existen también algunos métodos automatizados como Acces AMH, inmunoensayo con muy buen rendimiento analítico, configurándose como una alternativa al método manual de

medición, mostrando gran precisión y rapidez para la realización del inmunoensayo (Demidjian et al., 2016).

La estandarización de un marcador endocrino de reserva ovárica puede ser útil para seleccionar vacas donantes con alto potencial reproductivo y garantizar una mayor eficiencia en la producción de embriones *in vitro*. Sin embargo, no se ha encontrado en la revisión de artículos científicos la utilización de este marcador en hembras de la raza Brahman y tampoco su relación con la producción de embriones *in vitro* y menos en las condiciones del trópico colombiano.

1.6 Metodología

1.6.1. Animales

Esta propuesta hizo parte de un macro proyecto, financiado por Colciencias y ejecutado por la Universidad de La Salle y Embriogenex; siendo un experimento de uno de los objetivos específicos. El aval del comité de bioética presentado abarca el proyecto completo.

En la ganadería se seleccionaron 10 hembras bovinas de raza Brahman con registro de Asocebú. Los criterios de inclusión fueron hembras donantes de oocitos (vacas con más de 90 días de posparto), evaluación lineal excelente, no gestantes, evaluación reproductiva normal, y en sus dos ovarios más de 8 folículos antrales. Las vacas se mantuvieron en potrero con pasto *Brachiaria humidicola*, sal mineralizada, melaza y agua a voluntad.

Se realizó la sincronización del celo de las vacas: en el día cero (d0) se insertará un dispositivo intravaginal de 1,0 g de progesterona natural (DIB 1.0, Syntex S.A., Buenos Aires, Argentina) y 2 mg de benzoato de estradiol, I.M. (Benzoato de Estradiol, Syntex S.A., Buenos Aires, Argentina). En el momento del retiro del dispositivo (d8) se aplicaron 0,150 mg de

Cloprostenol intramuscular (Prostal®, Laboratorios Over, Santa Fe, Argentina) y 1 mg de cipionato de estradiol (Cipiosyn, Syntex S.A., Buenos Aires, Argentina). Las concentraciones séricas de AMH se determinaron de muestras de sangre tomadas los días 8, 13 y 23 con relación al día de la inserción del dispositivo.

Las muestras de sangre se colectaron por punción de la vena coccígea con tubos al vacío conteniendo EDTA., se aisló el plasma sanguíneo a través de centrifugación que fue almacenado en tubos plásticos de 1,5 ml y se almacenó a una temperatura de -80 °C hasta el momento de los análisis.

1.6.2. Situación geográfica

Las muestras de sangre fueron colectadas de hembras bovinas pertenecientes a la Hacienda Buenos Aires en Purificación, Tolima. Las pruebas de laboratorio se realizaron en el laboratorio de serología en la Universidad de La Salle, Sede Norte, Bogotá.

1.6.3. Enfoque de investigación

El enfoque de la investigación fue de carácter cuantitativo.

1.6.4. Variables

Para esta investigación fueron evaluadas las siguientes variables respuesta: Concentración de AMH (pg/mL), el coeficiente de variación intra ensayo (%); y el coeficiente de variación inter ensayo (%).

1.6.5. Métodos

La concentración de AMH se determinó con un kit de ELISA comercial para AMH bovina (Bovine AMH ELISA, ref: AL-114, Ansh Labs®), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para realizar la estandarización de la prueba se repitió el ensayo tres veces en días consecutivos

y con cada muestra en triplicado. Además se emplearon controles negativos y positivos para determinar la variación intra e inter ensayo al final del proceso de análisis de datos.

1.7. Resultados

En el presente estudio se logró determinar que no existen diferencias significativas en las concentraciones de AMH circulante en los diferentes días del ciclo estral en las hembras de raza Brahman (Tabla 1). Adicionalmente, se lograron determinar valores de referencia en cuanto a la concentración de la AMH en la raza Brahman, antes desconocidos, siendo esta concentración media 0,58 ng/ml.

La técnica inmunoenzimática fue validada, el ensayo resultó con un coeficiente de variación intra ensayo del 6,36%, y un coeficiente de variación inter ensayo de 8,31%.

La correlación entre el valor promedio de la AMH y el conteo folicular realizado en el día de la selección de los animales fue positiva, alta y significativa ($R^2 = 0,82$; $P=0,004$).

Tabla 1. Concentración de AMH, error estándar y valor-P en las diferentes tomas de acuerdo con el día del ciclo estral.

Toma	Concentración AMH (ng/ml)	Error estándar	Valor-P
Primera (D8)	0,625	0,070	0,632
Segunda (D13)	0,529	0,070	
Tercera (D23)	0,581	0,070	

En las figuras 1, 2 y 3 se observan los animales utilizados para este proyecto, la realización del análisis reproductivo como criterio de inclusión en el estudio y la ejecución de los análisis de laboratorio.



Figura 1. Bovinos hembra de raza Brahman de la hacienda Buenos Aires utilizadas en el proceso de investigación (Fuente: Elaboración propia).



Figura 2. Realización de evaluación ecográfica transrectal de las hembras en el proceso de selección de animales para la investigación (Fuente: Elaboración propia).

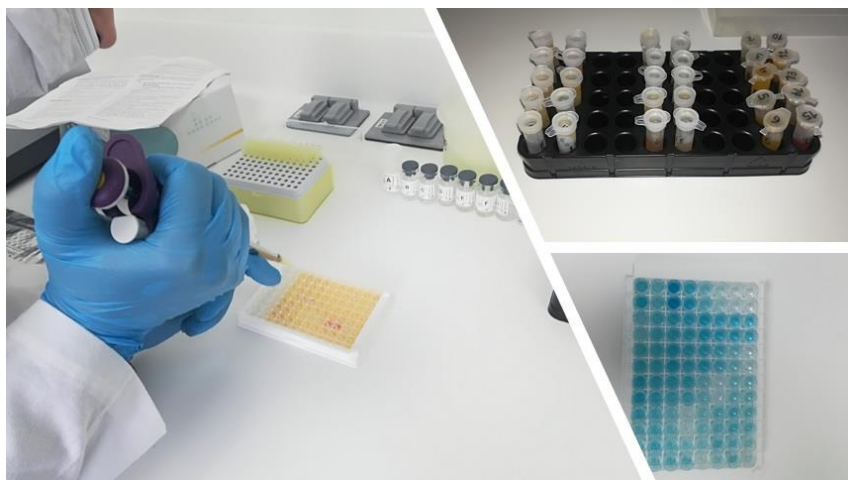


Figura 3. Ejecución de la técnica ELISA para la medición de AMH desarrollada en laboratorios de la Universidad de La Salle (Fuente: Elaboración propia).

1.8. Discusión

Los resultados obtenidos para los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron suficientemente bajos para permitir la utilización de la técnica de ELISA para AMH bovina como una herramienta biotecnológica confiable, mediante la cual se pueden obtener resultados repetibles y por ende ser utilizada como una herramienta de selección de hembras de la raza Brahman que cuenten con una mayor reserva ovárica de oocitos.

Con el fin de mejorar los parámetros productivos y reproductivos de los hatos en sistemas productivos de carne bovina en Colombia, es relevante la selección de animales teniendo en cuenta características de impacto económico sobre la producción animal y que apoyen los parámetros de evaluación subjetivos de los ganaderos y técnicos.

Por tradición, en la ganadería colombiana se premia aquel animal considerado el más bello en las pistas de juzgamiento, dejando en muchas ocasiones de lado aspectos tan importantes como la fertilidad de los animales, lo que lleva a la selección y multiplicación de individuos que cumplen con algunas características, que pueden considerarse irrelevantes si estas no se

traducen al final de cuentas en un animal funcional en el potrero, con una fertilidad que permita hacer sostenible económicamente el sistema.

Para lograr la eficiencia productiva en los sistemas, es fundamental buscar parámetros de selección que sean medibles, repetibles, y que dependan lo menos posible de la apreciación individual con el fin de reducir la subjetividad en los sistemas de selección de animales que serán utilizados como reproductores y que aportan características relevantes al hato nacional y le permitirán hacerlo más competitivo. De esta forma la utilización de la AMH como una herramienta de selección de hembras donantes puede auxiliar en la detección de los animales más fértiles.

La AMH es una hormona glicoproteica que durante la fase embrionaria tiene una importante labor en la diferenciación sexual del macho (Baldrighi et al., 2014). En la vida adulta esta hormona sigue estando presente, encargada de una función de control de crecimiento folicular y se relaciona con la hormona foliculoestimulante FSH, expresándose en los procesos de reclutamiento y selección de los oocitos que toma lugar de manera fisiológica en las hembras una vez llegan a la pubertad (Durlinger et al., 1999).

La hormona se detecta en sangre a partir de un inmunoensayo que cuenta con anticuerpos específicos que se encargan de capturar la AMH en el suero sanguíneo, que una vez se une forma complejos que se precipitan, y mediante reacciones generadoras de color permiten hacer lecturas en las cuales se correlacionan las concentraciones a través de la utilización de curvas que permiten determinar los valores de la hormona en cada una de las muestras. (Arce et al., 2014).

Los anticuerpos específicos previamente mencionados se encuentran en el mercado con funcionalidad específica para la AMH de algunas especies domésticas, entre las que se

encuentran por ejemplo pruebas para bovinos, ovinos y caprinos. Contando con límites de detección tan bajos como 0,4 ng/ml con una sensibilidad de 1,4 ng/ml (Arce et al., 2014).

Debe tenerse en cuenta que la concentración de la AMH está siempre relacionada de manera negativa con la edad, es decir, a mayor edad menor será la concentración en sangre de AMH que será detectada, lo que le otorga su funcionalidad como indicador de reserva ovárica, contando con la extraordinaria ventaja de permanecer constante en todas las fases del ciclo estral sin verse afectada por protocolos de sincronización realizados a las hembras (Batista et al., 2014; Arouche et al., 2015), como se pudo confirmar en el presente estudio, validando la utilización de esta metodología para las vacas de la raza Brahman.

La disminución en la concentración de AMH es de esperarse dado que la reserva ovárica se reduce conforme la hembra va presentando más ciclos estrales precisamente por un menor número de folículos acumulados, por lo que se debe recordar que la hormona es secretada por las células de la granulosa de folículos antrales de tamaño pequeño (Hafez et al., 2018).

En diferentes estudios realizados, se ha podido determinar que aquellas vacas que tuvieron una mayor respuesta a un tratamiento superovulatorio fueron aquellas que durante las diferentes fases del ciclo estral tuvieron mayores concentraciones (Arouche et al., 2014). De igual modo se puede evidenciar la gran versatilidad de utilizar la AMH como indicador de la funcionalidad ovárica y su relación con gonadotropinas y hormonas esteroideas durante la fase de la pubertad al haber sido relacionadas con un mayor desarrollo de las glándulas mamarias durante la fase de la pubertad según la concentración en sangre fue más alta (Hafez et al., 2019).

Se ha establecido una correlación positiva entre el número de oocitos obtenidos en un protocolo de superovulación y su posterior aspiración, y niveles plasmáticos de AMH, por

lo que concluyeron que la técnica permite realizar la identificación de grupos de vacas con el potencial de ser buenas o malas donantes de oocitos. En este estudio se observó también que, aunque la AMH puede ser un indicador del número de oocitos, no puede ser considerada un indicador de calidad o viabilidad de los embriones que puedan surgir de su fertilización in vitro, puesto que no hallaron relación entre los niveles de AMH y la tasa de éxito en cuanto al número de embriones producidos. Se señala de igual modo que los niveles de AMH tienen el potencial de ser utilizados como herramienta para el diagnóstico de algunas patologías reproductivas, tales como pueden ser el síndrome de hiperestimulación, tumores de células de la granulosa o el síndrome de ovario poliquístico, demostrando el gran camino que tiene por delante el desarrollo de otras pruebas y experimentos asociados a la medición de esta hormona. (Vernunft et al. 2014)

Esto se traduciría en protocolos en los cuales se pudieran obtener más oocitos por aspiración y de ese modo aumentar la tasa de éxito de la fertilización de embriones in vitro, teniendo así la posibilidad de generar animales con características excepcionales con intervalos generacionales menos amplios optimizando la utilización de recursos genéticos considerados valiosos por su potencial capacidad productiva y reproductiva, influyendo positivamente de sobre la fertilidad en los sistemas productivos dedicados a la venta de material genético y de los mismos sistemas de cría.

Se ha buscado hallar correlaciones entre las concentraciones altas de AMH en vacas y algunos parámetros productivos de interés. Así ocurrió con un grupo de vacas de raza Holstein, donde investigaron la relación entre las concentraciones circulantes de AMH y la longevidad productiva, sin embargo, según los autores no fue posible hallar una correlación entre estos dos parámetros, pero sí pudieron observar que aquellos animales que tenían

concentraciones de AMH más elevados, históricamente habían tenido un mejor y destacado desempeño reproductivo, por lo que se plantearon en un futuro estudiar la heredabilidad de la concentración de AMH circulante (Jiménez et al. 2015).

La concentración de AMH circulante resulta útil en la identificación de animales que probablemente van a tener una mejor respuesta a un tratamiento con gonadotropinas al realizar protocolos de superovulación, siendo aquellas vacas con concentraciones más elevadas, las mejores donantes de oocitos, y las mejores candidatas para participar en programas de producción de embriones *in vitro* (Baruselli et al. 2015). Por lo que se espera en el futuro con investigaciones complementarias aplicadas en campo, se pueda llegar a seleccionar animales utilizando como criterio sus niveles circulantes de AMH, ya que se esperaría tengan un potencial reproductivo mayor, e inclusive aquellas vacas con niveles más elevados de AMH circulante ser más longevas y productivas, permitiendo que gracias a la rentabilidad ofrecida al productor permanezcan más tiempo al interior del sistema productivo.

En cuanto a la toma de mediciones de la concentración de AMH obtenidas en animales luego de realizarles un protocolo de sincronización de celo, respecto a muestras obtenidas de animales que se encontraran ciclando de forma natural, se demostró que no hay diferencias entre los valores obtenidos al comparar ambos escenarios, corroborando los resultados observados en este estudio con vacas de la raza Brahman.

La prueba ELISA AMH recombinante bovina con la cual se miden las concentraciones circulantes de la hormona puede presentar un coeficiente de variación intraensayo entre 3,4 y 11,3% para concentraciones de AMH que se encuentren entre el rango de 23,68 y 1,74 ng/ml. Su coeficiente de variación interensayo puede estar entre el 4,8 y el 20,5% para

concentraciones que estén entre 25,53 y 1,42 ng/ml. Su límite de detección es de 0,4 ng/ml, teniendo una sensibilidad funcional de 1,4 ng/ml (Arce et al., 2014; Demiddian et al., 2016). Los estudios que involucran mediciones de las concentraciones de AMH circulante se han realizado en varias razas de bovinos y algunas otras especies de interés zootécnico, hallando por ejemplo en vacas de raza Tabapua, *Bos indicus* brasilero cuyo fin zootécnico es la producción de carne, valores promedio de 1,60 ng/ml, con rangos desde 0,014 hasta 4,516 ng/ml (Maculan et al. 2018). Aquellos animales considerados reproductivamente más sobresalientes (evaluando diferentes parámetros de su historial reproductivo) y aquellos que en el momento de la realización del estudio tuvieron un conteo mayor de folículos antrales observados mediante evaluación ecográfica presentaron concentraciones promedio de 1,15 ng/ml, los animales con un rendimiento intermedio tuvieron una concentración promedio de 0,73 ng/ml, y finalmente aquellos individuos que presentaron de forma histórica un rendimiento inferior tuvieron una concentración media de 0,44 ng/ml. Nuevamente en este estudio, como en los previamente mencionados, se halló una correlación positiva entre una concentración alta de AMH circulante y el número de folículos antrales observados (Maculan et al. 2018).

En otro estudio realizado, se buscó el establecer una correlación directa entre el conteo de folículos antrales y las concentraciones plasmáticas de AMH, teniendo en esta ocasión la intención de realizar una comparación entre novillas de las razas Gyr y Holstein, y novillas bufalinas de la raza Murrah. Estos animales no fueron sometidos a protocolo de sincronización alguno, sino por el contrario, se tomaron las muestras independientemente de la fase del ciclo estral en la que se encontraran las hembras muestreadas. Los resultados obtenidos fueron los siguientes, para la raza Gyr se obtuvo una concentración promedio de

0,60 ng/ml, mientras que para la raza Holstein se obtuvieron valores de 0.24 ng/ml. Finalmente para las novillas bufalinas de raza Murrah se obtuvieron valores de 0.18 ng/ml en promedio. En este estudio concluyeron que las concentraciones promedio de las razas *indicus* eran más altas que aquellas de las razas *taurus*, y por debajo de las dos razas anteriormente mencionadas, se encontraban las concentraciones de la especie bufalina representada por la raza Murrah, diferencia explicada entre otras razones por un menor conteo de folículos antrales en el momento de la evaluación ecográfica en las búfalas, característica ya previamente observada en estudios anteriores, y por diferencias fisiológicas reproductivas entre las hembras de las especies bovina y bufalina (Baldrighi et al. 2014).

Para la raza Angus se encontró una concentración promedio de AMH de 0,0703 ng/ml, para la raza Charolais fue de 0,0406 ng/ml, para la raza Holstein se obtuvo una concentración promedio de 0,0282 ng/ml, mientras que para la raza Jersey se obtuvo una concentración de 0,0464 ng/ml durante la sincronización de celo y ciclo estral natural (Pfeiffer et al. 2014).

De acuerdo con otro estudio, la concentración de AMH promedio encontrada en bovinos hembra de raza Holstein fue de 0,368 ng/ml, quienes obtuvieron mediciones en el rango de 0,091-1,391 ng/ml. (Vernunft et al. 2014).

Nuevamente en otra investigación, pudo corroborarse la correlación positiva existente entre los niveles de AMH circulante y el número de folículos antrales encontrados, sin existir una relación entre la cantidad y la calidad de los oocitos obtenidos. En este mismo estudio se midió la concentración plasmática de AMH en hembras Holstein y Nelore, dando como resultado 0,3 ng/ml y 1,0 ng/ml respectivamente (Guerreiro et al. 2014).

En la tabla 2 se encuentran los resultados de diversos estudios que buscaron determinar los niveles medios de AMH encontrados en las especies bovina (representada por varias razas)

y bufalina (representada por la raza Murrah). Las concentraciones de AMH encontradas en los diferentes estudios por diferentes autores, han sido clasificadas de mayor a menor con el fin de organizar la información y que esta sea más fácilmente comparable.

Tabla 2. Concentraciones promedio de AMH encontradas en la especie bovina en estudios realizados en distintas razas por diferentes autores.

<i>Bos indicus</i>		
Raza	AMH (ng/mL)	Autores
Tabapua	1,60	Maculan et al. 2018
Nelore	1,00	Guerreiro et al. 2014
Gyr	0,60	Baldrighi et al. 2014
Brahman	0,57837	Presente estudio
<i>Bos taurus</i>		
	0,368	Vernunft et al. 2014
Holstein	0,3	Guerreiro et al. 2014
	0,24	Baldrighi et al. 2014
	0,0382	Pfeiffer et al. 2014
Angus	0,0703	Pfeiffer et al. 2014
Jersey	0,0464	Pfeiffer et al. 2014
Charolais	0,0406	Pfeiffer et al. 2014

Las concentraciones circulantes de AMH son superiores en animales *Bos indicus* que en animales *Bos taurus*. De igual modo, con este estudio se logró evidenciar que entre los *Bos indicus* la raza Brahman presentó valores más bajos comparados con Tabapua, Nelore y Gyr.

1.9. Conclusiones

A través de este estudio es posible afirmar que las vacas Brahman, donantes de oocitos para la producción de embriones *in vitro*, presentaron una concentración promedio de 0,58 ng/ml, que no presenta variación entre los diferentes días del ciclo estral. Adicionalmente, el kit comercial de ELISA para análisis de AMH en bovinos es una metodología confiable para hembras de la raza Brahman.

Algunas ventajas de la utilización de la AMH como una herramienta de selección son la posibilidad de realizarla a hembras independientemente de la etapa del ciclo estral en la cual se encuentren, lo que confiere una alta probabilidad de aceptación por parte de productores y académicos, además de poder obtener de forma práctica y en edades tempranas el pronóstico sobre el rendimiento reproductivo futuro de animales, permitiendo tomas de decisiones asertivas.

Lista de Tablas

Tabla 1. Concentración de AMH, error estándar y valor-P en las diferentes tomas de acuerdo con el día del ciclo estral.

Tabla 2. Concentraciones promedio de AMH encontradas en la especie bovina en estudios realizados en distintas razas por diferentes autores.

Lista de Figuras

Figura 1. Bovinos hembra de raza Brahman de la hacienda Buenos Aires utilizadas en el proceso de investigación.

Figura 2. Realización de evaluación ecográfica transrectal de las hembras en el proceso de selección de animales para la investigación.

Figura 3. Ejecución de la técnica ELISA para la medición de AMH desarrollada en laboratorios de la Universidad de La Salle.

Lista de Anexos

Anexo 1. Concepto del comité de ética.

Bogotá, 25 de mayo de 2017.

Doctora
LILIANA CHACÓN JARAMILLO
Investigadora

Apreciada Dra. Chacón, cordial saludo.

El Comité de Ética en Investigación de la Universidad en sesión realizada el 25 de mayo de 2017, hizo revisión de la documentación del siguiente proyecto y acordó emitir el respectivo concepto así:

Proyecto	Potencial genético y fenotípico de la hembra bovina donante de oocitos para la producción de embriones in vitro
Investigador	Liliana Chacón Jaramillo
Concepto	Avalado

Es importante tener en cuenta que este concepto sólo aplica para los procedimientos en las condiciones y con las características indicadas en el formato final y documentos presentados. El investigador deberá informar sobre cualquier cambio que se proponga incluir y que esté relacionado con la ubicación, el cuidado y bienestar de los animales, estas modificaciones no podrán ejecutarse sin el aval previo del Comité; así mismo, se debe dar aviso sobre cualquier situación imprevista que se considere implique algún riesgo para los animales o la comunidad en el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.

Agradezco la atención prestada.



LUIS FERNANDO RAMÍREZ HERNÁNDEZ
Presidente Comité de Ética en Investigación

Anexo: Copia de la Resolución No 235 de 2014 de Rectoría, por medio del cual se conforma el Comité de Ética en Investigación Institucional

1.10 Referencias bibliográficas

- Abdel Hafez, F. F., Tang, Y., Hassan, M. H., & Saleem, T. H. (2018). *Assessment of Anti-Mullerian Hormone (AMH) levels in a pilot cohort of peripubertal females: Correlation with sex maturity rating (SMR)*. Middle East Fertility Society Journal. <https://doi.org/10.1016/j.mefs.2018.01.004>.
- Arce, J.-C., Nyboe Andersen, A., Fernández-Sánchez, M., Visnova, H., Bosch, E., García-Velasco, J. A., ... Fauser, B. C. J. M. (2014). *Ovarian response to recombinant human follicle-stimulating hormone: a randomized, antimüllerian hormone–stratified, dose–response trial in women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection*. *Fertility and Sterility*, 102(6), 1633–1640.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.08.013>
- Arouche, N., Picard, J.-Y., Monniaux, D., Jamin, S. P., Vigier, B., Josso, N., ... Taieb, J. (2015). *The BOC ELISA, a ruminant-specific AMH immunoassay, improves the determination of plasma AMH concentration and its correlation with embryo production in cattle*. *Theriogenology*, 84(8), 1397–1404. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.026>
- Baldrighi, J. m, 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*, 49(6), 1015–1020. <https://doi.org/10.1111/rda.12430>

- Baruselli, P. S., Batista, E. O. S., Vieira, L. M., & Souza, A. H. (2015). *Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle*. Anim. Reprod, 12(3), 487-497.
- Batista, E., Macedo, G., Sala, R., Ortolan, M., Sá Filho, M., Del Valle, T., ... Baruselli, P. (2014). *Plasma Antimüllerian 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>
- Demirdjian, G., Bord, S., Lejeune, C., Masica, R., Rivière, D., Nicouleau, L., ... & Marquet, P. Y. (2016). *Performance characteristics of the Access AMH assay for the quantitative determination of anti-Müllerian hormone (AMH) levels on the Access* family of automated immunoassay systems*. Clinical biochemistry, 49(16-17), 1267-1273. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.08.005>
- Durlinger, A. L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F. H., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A., & Themmen, A. P. (1999). *Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary*. Endocrinology, 140(12), 5789–5796. <https://doi.org/10.1210/endo.140.12.7204>
- Guerreiro, B. M., Batista, E. O. S., Vieira, L. M., Sá Filho, M. F., Rodrigues, C. A., Netto, A. C., ... & Accorsi, M. (2014). *Plasma anti-müllerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from Bos taurus and Bos indicus donors*. Domestic animal endocrinology, 49, 96-104.
- Hayes, E., Kushnir, V., Ma, X., Biswas, A., Prizant, H., Gleicher, N., & Sen, A. (2016). *Intra-cellular mechanism of anti-Müllerian hormone (AMH) in regulation of follicular*

development. *Molecular and cellular endocrinology*, 433, 56-65.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.05.019>

- Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D. M., Neuder, L. M., Ireland, J. L. H., Pursley, J. R., Smith, G. W., ... & Lonergan, P. (2015). *Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life*. *Journal of dairy science*, 98(5), 3036-3045.
- Laboratorios IDEXX. (2010). *ELISA technical guide*. Julio 30, 2018, de IDEXX Sitio web: http://www.idexx.es/pdf/es_es/livestock-poultry/elisa-technical-guide.pdf
- Maculan, R., Pinto, T. L. C., Moreira, G. M., de Vasconcelos, G. L., Sanches, J. A., Rosa, R. G., ... & de Souza, J. C. (2018). *Anti-Müllerian Hormone (AMH), antral follicle count (AFC), external morphometrics and fertility in Tabapuã cows*. *Animal reproduction science*, 189, 84-92.
- Monniaux, D., Barbey, S., Charlène Rico, Fabre, S., Gallard, Y., & Larroque, H. (2010). *Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle?* *Reproduction, Fertility, and Development*, 22(7), 1083–1091.
<https://doi.org/10.1071/RD09279>
- Pfeiffer, K. E., Jury, L. J., & Larson, J. E. (2014). *Determination of anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle*. *Domestic Animal Endocrinology*, 46, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2013.05.004>
- Rico, C., Fabre, S., Médigue, C., di Clemente, N., Clément, 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, C., Médigue, C., Fabre, S., Jarrier, P., Bontoux, M., Clément, F., & Monniaux, D. (2011). *Regulation of Anti-Müllerian Hormone Production in the Cow: A Multiscale Study at Endocrine, Ovarian, Follicular, and Granulosa Cell Levels*. *Biology of Reproduction*, 84(3), 560–571. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088187>
- Visser, J. A., Jong, F. H. de, Laven, J. S. E., & Themmen, A. P. N. (2006). *Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function*. *Reproduction*, 131(1), 1–9. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00529>
- Wiweko, B., Anggraheni, U., Mansyur, E., Yuningsih, T., Harzief, A. K., Pratama, G., ... & Hestiantoro, A. (2016). *Serum AMH level predicts oocytes quality better than follicular fluid AMH level*. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(5), 361-364. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.07.011>.
- Vernunft, A., Schwerhoff, M., Viergutz, T., Diederich, M., & Kuwer, A. (2014). *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*.