



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**RELACIÓN ENTRE RESERVA OVÁRICA, HORMONA
ANTIMULLERIANA, PRODUCCIÓN DE EMBRIONES Y
TRATAMIENTO CON FSH**

Camila Brochado Simoes Pires

TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY
2024**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**RELACIÓN ENTRE RESERVA OVÁRICA, HORMONA
ANTIMULLERIANA, PRODUCCIÓN DE EMBRIONES Y
TRATAMIENTO CON FSH**

Camila Brochado Simoes Pires

Alejo Menchaca
Director de Tesis

Álvaro García-Guerra
Codirector

2024

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Dr. Jorge Gil; DVM, MSc, PhD

Facultad de Veterinaria, Universidad de la

República, Uruguay

Dra. Isabel Vásquez; DVM, MSc, PhD

Facultad de Veterinaria, Universidad de la

República, Uruguay

Dr. Felipe Zandonadi Brandão; DVM, MSc,

PhD;

Facultad de Veterinaria, Universidade

Federal Fluminense, Brasil

ACTA DE DEFENSA DE TESIS



Centro de Posgrados
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

ACTA DEFENSA DE TESIS DE MAESTRIA

ORIENTACIÓN: MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: 06/05/2024 - Facultad de Veterinaria

TRIBUNAL: Jorge Gil (presidente), M. Isabel Vázquez, Felipe Zandonadi Brandão

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
5.674.278-7	Camila Brochado Simoes Pires	S.S.S.	12

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

El tribunal considera que la Dra. Camila Brochado realizó un estudio que aporta información valiosa al conocimiento sobre el potencial de la producción de embriones ovinos en base a parámetros de la donante y a tratamientos de superovulación. Es un trabajo de investigación significativo, que cuenta con un artículo publicado en una revista internacional arbitrada y un resumen en la IETS 2024, además de que involucró la participación de investigadores de otras universidades en USA, donde se realizó el experimento. El tribunal ha señalado que el manuscrito en términos generales se encuentra muy bien estructurado y escrito. La presentación oral fue muy clara, organizada y la maestranda hizo una buena administración del tiempo. En la etapa de la defensa, ante las preguntas y sugerencias de este Tribunal, mostró seguridad en los resultados de su trabajo / abrió la posibilidad a conversar sobre algunos detalles del mismo.

En resumen, este Tribunal considera que tanto el trabajo escrito como la presentación y defensa oral del mismo, dan mérito para adjudicar la calificación máxima.

TRIBUNAL FIRMA


Dra. M. Isabel Vázquez


Dr. Felipe Zandonadi Brandão

Asinado de forma digital por
Felipe Zandonadi
Brandao06037261721
Datos: 2024.05.07 07:51:27
-03'00'


Dr. Jorge Gil

INFORME DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue un trabajo realizado entre la Fundación IRAUy y *The Ohio State University* donde el apoyo de los integrantes de ambos grupos fue fundamental para que se pudiese llevar a cabo dicha maestría. El apoyo financiero para realizar mis estudios de posgrado fue gracias a la beca de maestría de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII). El proyecto de investigación fue financiado por *The Ohio State University* (Columbus, EE. UU.).

Expreso mi agradecimiento a mi tutor y orientador Alejo Menchaca y co-tutor Álvaro García-Guerra. Alejo también fue mi tutor en mi tesis de grado y agradezco su apoyo, confianza a la hora de abrirme las puertas en la investigación y orientación en todo ese tiempo. Agradezco a Álvaro también por toda su orientación, paciencia y enseñanza durante toda la maestría. Ambos tutores me inspiran con su vocación a la investigación científica.

Agradezco a todo el equipo de IRAUy: Andrea Pinczac, Camila García-Pintos, Federico Cuadro, Marcela Souza, Rosalia Morales, Richard Núñez. Realmente fue un honor y placer trabajar con todos ellos, son un muy lindo equipo humano. Gracias a todos por su amistad.

Agradezco a todo el equipo de *The Ohio State University* y de *The Eastern Agricultural Research Station* por todo su apoyo para realizar este experimento. Quiero agradecer en especial a mi compañero de experimento Ben Duran, por su trabajo a la par y su amistad.

Agradezco al Instituto Pasteur de Montevideo y Martina Crispo por también abrirme las puertas durante este período de formación.

Por último y no menos importante, agradezco a mis padres, Ana y Joaquim, hermanas, Juliana y Amanda, mi compañero Andrés, y amigas por su apoyo. Son la red de amor que siempre me dan confianza y fuerza para cada nuevo paso de la vida.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
ÍNDICE	II
PUBLICACIONES	III
RESUMEN	IV
SUMMARY	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	2
2.1. Tratamientos de superovulación en ovejas	3
2.2. Reserva ovárica: correlación con tasa ovulatoria y producción de embriones.....	4
2.3. Marcadores de la reserva ovárica	5
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	6
4. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN	8
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
5.1. Animales y manejo.....	9
5.2. Tratamiento hormonal e inseminación	9
5.3. Conteo de folículos antrales	11
5.4. Muestras de sangre para análisis de AMH.....	12
5.5. Respuesta ovárica y colecta embrionaria	12
5.6. Análisis estadístico	13
6. RESULTADOS	14
6.1. Conteo de folículos antrales	14
6.2. Concentraciones séricas de AMH	16
6.3. Respuesta ovárica y producción de embriones en ovejas tratadas con 6 vs 8 dosis de FSH	16
6.4. Longitud de tratamiento de FSH en grupos de Baja y Alta AMH	18
7. DISCUSIÓN.....	20
8. CONCLUSIONES	25
9. BIBLIOGRAFÍA	26

PUBLICACIONES

La información generada en este experimento fue utilizada para generar el artículo científico:

Brochado C., Duran B. J., Kieffer J.D., Pinczak A., Menchaca A., Garcia-Guerra A. (2024) Reduced embryo yield obtained from superstimulated ewes with low circulating AMH concentration is improved by lengthening the FSH treatment. *Theriogenology* 218: 79-88

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar la relación entre la reserva ovárica y longitud del protocolo de superovulación en ovejas, y su efecto sobre la tasa ovulatoria y la producción de embriones. El estudio se realizó en 63 ovejas de la raza Poll Dorset y cruce Poll Dorset x Suffolk en las que se administró un tratamiento de superestimulación ovárica con FSH durante la primera onda folicular (Protocolo Día 0). Luego de la sincronización de la ovulación, durante la primera onda folicular y se administró un total de 240 mg de FSH junto a la colocación de un dispositivo intravaginal con progesterona (CIDR) desde la primera dosis (día 0) hasta la última dosis de FSH. Las ovejas fueron asignadas a dos grupos experimentales para recibir la dosis total de FSH distribuida en seis dosis decrecientes (grupo de 6 dosis, $n = 30$) u ocho dosis decrecientes (grupo de 8 dosis, $n = 33$) dos veces al día a cada 12 horas. El conteo de folículos antrales (AFC) y las concentraciones séricas de la hormona antimulleriana (AMH) se determinaron al día -9 y día 0 del experimento. Luego del tratamiento superovulatorio, las ovejas recibieron una dosis de GnRH (24 horas luego de retirar el CIDR) y se realizó una inseminación artificial (IA) por laparoscopia 16 horas más tarde. La determinación de la respuesta ovárica por laparoscopia y colecta quirúrgica de embriones en ovejas con > 2 cuerpos lúteos (CL) fueron realizadas a los 6 días posteriores a la IA. El número de AFC y los niveles AMH tuvieron relaciones positivas con respuesta ovárica, estructuras colectadas totales y estructuras fertilizadas. El número de CL tendió ($P < 0,10$) a ser menor en las ovejas del grupo de 6 dosis que en el de 8 dosis de FSH. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en otras variables de producción de embriones entre ambos tratamientos (6 vs. 8 dosis). Para comparar la respuesta de ovejas con baja y alta AMH, se analizaron los resultados del 35% de las ovejas con menores concentraciones de esta hormona ($n = 23$) vs. el 35% de las ovejas con mayores concentraciones ($n = 22$). En ovejas con AMH alta, el porcentaje de fertilizados tendió a ser mayor para el tratamiento de 6 dosis ($P < 0,10$) que, para el tratamiento de 8 dosis, pero no se encontraron diferencias significativas en ninguna otra variable ($P = NS$). Sin embargo, en las ovejas con bajos niveles de AMH el número de embriones transferibles, embriones congelables y el porcentaje de estructuras fertilizadas fueron mayores ($P < 0,05$) para las ovejas que recibieron el tratamiento con 8 dosis contra el tratamiento de 6 dosis. En conclusión, la prolongación de la duración del tratamiento de superovulación de 6 a 8 dosis de FSH en ovejas con bajos niveles de AMH, puede favorecer la respuesta a la superovulación; y la determinación de la reserva ovárica mediante AMH puede auxiliar a predecir la respuesta de las hembras a los programas de producción de embriones *in vivo*.

Palabras clave: MOET, fertilidad, reserva folicular, superovulación, AMH, AFC, ovejas

SUMMARY

The objective of this thesis was to evaluate the relationship between ovarian reserve (at this instance measured with antral follicle count and levels of anti-müllerian hormone); and length of the superovulation protocol of the first follicular wave in sheep on ovulatory rate and embryo yield. The experiment was performed on 63 Poll Dorset and cross Poll Dorset x Suffolk ewes. All ewes received an ovarian superstimulation treatment during the first follicular wave (Day 0 Protocol). After the synchronization of ovulation, a total dose of 240 mg of FSH was used for superovulation treatment and a new CIDR was used from the first to the last dose of FSH, as a source of progesterone. Sheep were randomized to receive the total dose of FSH distributed in six decreasing doses (6-dose group, n = 30) or eight decreasing doses (8-dose group, n = 33) twice daily every 12 hours. On days -9 and 0, ovarian ultrasound was performed for antral follicle count (AFC) and blood samples were collected for anti-müllerian hormone (AMH) measurement. Intrauterine artificial insemination (IA) was performed by laparoscopy 16 hours after GnRH administration. Ovarian response was determined by laparoscopy 6 days after AI and embryos/ova were surgically collected from ewes with >2 corpora lutea (CL). The number of CLs tended ($P < 0,10$) to be lower in ewes in the 6-dose group than in the 8-dose group. However, no significant differences ($P = NS$) were found in other embryo yield variables when comparing only treatment length. AFC and AMH levels had positive relationships with ovarian response, total collected structures, and fertilized ova. Ewes were grouped into low and high AMH groups based on AMH levels. In sheep with high AMH, the percentage of fertilized ova had a tendency for a higher value for the 8-dose treatment ($P < 0.10$), but no significant differences were found in any other variable ($P = NS$). For ewes with low AMH levels, the number of transferable and freezable embryos and the percentage of fertilized structures were significantly higher for ewes receiving the 8-dose. In conclusion, extending the length of the superovulation treatment from 6 to 8 doses of FSH may be beneficial to those females with low ovarian reserve; and the use of ovarian reserve markers such as AFC and AMH can help predict response in *in vivo* embryo production programs.

Keywords: MOET, Fertility, ovarian reserve, superovulation, AMH, AFC.

1. INTRODUCCIÓN

La superovulación y producción de embriones (por su sigla en inglés, Multiple Ovulation and Embryo Transfer, MOET) hace parte de la segunda generación de las biotecnologías de la reproducción y permite un salto en la multiplicación de hembras con alta performance productiva. En ovinos es una tecnología que viene siendo utilizada en las últimas décadas pero que todavía presenta limitantes que dificultan su aplicación en condiciones comerciales y de investigación. Uno de los principales factores limitantes es la alta variabilidad entre hembras en la respuesta ovárica a tratamientos superovulatorios, la cual ha sido reportada en ovinos, caprinos y bovinos (Cognié et al., 2003; Mapletoft & Bó, 2013; Menchaca et al., 2010; Monniaux et al., 2011). En pequeños rumiantes, el conocimiento sobre ondas y dominancia folicular adquirido mediante ultrasonografía para estudiar la fisiología ovárica (Evans, 2003; Gonzalez-Bulnes et al., 2002; Rubianes & Menchaca, 2003) ha permitido el diseño de nuevos protocolos hormonales para la superestimulación ovárica (Menchaca et al., 2009). Como la inducción de la ovulación del folículo dominante estimula la aparición de la primera onda folicular (Día 0 del ciclo ovulatorio), se propuso en estas especies que la superestimulación de la primera onda folicular podría potenciar la respuesta ovárica y la producción de embriones (Menchaca et al., 2009). Esta estrategia, denominada «Protocolo Día 0», en comparación con los protocolos tradicionales utilizados en los programas MOET en ovejas (Menchaca et al., 2009) y cabras (Menchaca et al., 2007) resultó en mejor respuesta ovárica y mayor producción de embriones. En los últimos avances del Protocolo Día 0, Cuadro et al., (2018) investigaron los beneficios de la exposición a altas concentraciones de progesterona durante el tratamiento de superovulación mediante la adición de una fuente exógena de progesterona sobre la producción *in vivo* de embriones, resultando en mayor tasa de fertilización y calidad embrionaria superior. Con respecto a la producción *in vitro*, Menchaca et al., (2018) demostraron mayor tasa de clivaje y desarrollo embrionario en las hembras que recibieron el agregado de una fuente de progesterona exógena durante el tratamiento superovulatorio. Sin embargo, aún con estas propuestas recientes al Protocolo Día 0, las cuales mejoraron el rendimiento embrionario *in vivo* e *in vitro* (Cuadro et al., 2018; Menchaca et al., 2018), la variabilidad entre donantes aún no se ha resuelto por completo y se requieren más investigaciones.

La alta variación en la reserva ovárica (cantidad de folículos presentes en el ovario) entre individuos es uno de los principales factores que contribuye a la alta variabilidad de la respuesta ovárica a tratamientos de superovulación (Mossa et al., 2017). Así, la evaluación de la reserva ovárica puede explicar, al menos en parte, el éxito de las biotecnologías reproductivas en diferentes especies (Baruselli et al., 2015).

La determinación de la reserva ovárica de las donantes previo a la producción de embriones *in vivo* puede auxiliar en la predicción de la respuesta a la superovulación, eso puede lograrse mediante el conteo de folículos antrales (AFC, por su sigla en inglés) por ultrasonografía transrectal, o mediante determinaciones en sangre de aquellas hormonas asociadas a la reserva ovárica. Esta última estrategia ha sido explorada en varios estudios y la hormona

antimulleriana (AMH, por su sigla en inglés) aparece como un indicador promisorio de la reserva ovárica en diferentes especies, incluidos los ovinos (Lahoz et al., 2014; Monniaux et al., 2011; Rico et al., 2009; Torres-Rovira et al., 2014). Se ha propuesto la determinación de las concentraciones de AMH circulante antes del tratamiento con FSH para identificar a aquellas hembras con un mayor número de folículos sensibles a las gonadotrofinas (Lahoz et al., 2012, 2014; Mossa et al., 2017; Rico et al., 2009; Visser et al., 2006). En mujeres, la determinación de AMH antes de la superestimulación es utilizada de forma rutinaria para predecir el estatus ovárico (Moolhuijsen & Visser, 2020). Sin embargo, la información disponible sobre los niveles de AMH en ovejas y su relación con AFC, así como su uso como herramienta predictora de la respuesta superovulatoria, es escasa.

En ovejas y cabras, el tratamiento con FSH se administra a través de un régimen de inyecciones múltiples durante tres o cuatro días (es decir, 6 u 8 dosis administradas cada 12 horas). La duración de este régimen se estableció para mantener niveles adecuados de FSH durante un período determinado para que sea eficaz sobre el reclutamiento folicular (Bo et al., 1994; Laster, 1972; Yamamoto et al., 1994). La conveniencia de administrar este tratamiento con FSH en 6 u 8 dosis no está suficientemente clara en pequeños rumiantes, y debido a que los protocolos deben ser cada vez más simples y de fácil administración la posibilidad de reducir la duración del tratamiento requiere más investigación. Por otro lado, el período de exposición a FSH exógena podría afectar la respuesta ovárica a la superovulación, principalmente en aquellas donantes que muestran una baja respuesta a los tratamientos de superovulación, resultado que puede estar relacionado a baja reserva ovárica. Esto lleva a proponer que la baja respuesta ovulatoria de estos animales podría verse beneficiada al tener mayor tiempo de exposición a la FSH.

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Dominancia Folicular en Ovejas

El conocimiento sobre el patrón de desarrollo de los folículos antrales ováricos es muy importante para perfeccionar las técnicas reproductivas en ovinos. A partir del uso de la ultrasonografía en modo B se ha logrado un mejor entendimiento de la fisiología reproductiva ovina para continuar hacia la búsqueda de nuevas estrategias de manipulación del desarrollo folicular y la reproducción en ovejas (Evans, 2003).

El patrón de desarrollo de los folículos ováricos en ondas foliculares fue propuesto por primera vez en bovinos en los años 1960s por Rajakoskia partir de un trabajo precursor para la época. Ese concepto derivó en una serie de muchos trabajos en la búsqueda de entender la dinámica folicular ovárica que no llegaron a confirmar esta propuesta hasta los años 1980s. Recién en estos años, mediante el uso de la ultrasonografía primero en vacas y luego en ovejas (Ginther et al., 1995; C. J. H. Souza et al., 1997) fue posible realizar el seguimiento del crecimiento folicular día a día (Evans et al., 2000). Así fue posible demostrar de manera inequívoca que las ovejas tienen un patrón de crecimiento folicular en forma de ondas u oleadas (Evans et al., 2000; Gibbons et al., 1999).

Una onda folicular empieza sobre la influencia de un aumento en las concentraciones de FSH, esto ocurre por la desaparición del efecto inhibitorio producido por el folículo dominante de la onda antecedente, esta desaparición ocurre a partir de la ovulación o atresia de ese folículo dominante (Scaramuzzi et al., 2011). A partir de ese mecanismo se inicia la fase de emergencia folicular, la cual se caracteriza por un crecimiento sincrónico de folículos pequeños (en la oveja menores a 4 mm de diámetro). Los folículos que son reclutados en una onda son dependientes de la hormona FSH. Luego de aproximadamente tres días de la emergencia folicular, se presenta una segunda fase de la onda folicular, en la cual uno o más folículos son seleccionados y continúan creciendo hasta llegar a un estatus ovulatorio, en ovejas el diámetro es de 5 a 8 mm. Esos folículos desarrollan receptores de la hormona LH en las células de la granulosa y se transforman en independientes a FSH. La dominancia de un folículo ovulatorio es producida por su propia secreción de estradiol, inhibina A y androstenediona, esto causa la atresia de los demás folículos emergentes en la onda (Evans, 2003; Scaramuzzi et al., 2011).

A partir de diversos estudios también se pudo concluir que la dominancia folicular se expresa en la habilidad de un folículo en un ovario de inhibir el desarrollo de los demás folículos en ambos ovarios, mientras el folículo dominante continúa su desarrollo (Fortune, 1994). Este fenómeno de dominancia folicular tiene un efecto importante sobre tratamientos de superovulación que perjudica la respuesta ovárica y por esa razón es muy importante tenerlo en cuenta al momento de formular tratamientos a utilizar.

2.1. Tratamientos de superovulación en ovejas

Los protocolos de superovulación se basan en la administración de una hormona que estimule el crecimiento folicular en conjunto con otras hormonas necesarias para sincronizar la ovulación. La primera gonadotrofina utilizada en estos protocolos para estimular el desarrollo folicular fue la gonadotrofina coriónica equina (eCG) (Cognie, 1999), siendo una hormona que presenta una vida media en sangre bastante prolongada (alrededor de 40 horas, y persiste 10 días en la circulación en bovinos) (Mapletoft & Bó, 2013). Su vida media prolongada tiene la facilidad de requerir una única dosis, pero también se asocia a efectos no deseados como el aumento del número de folículos anovulatorios, la baja calidad embrionaria, y la formación de anticuerpos por utilización reiterada que puede disminuir su efecto (Baril et al., 1996). Desde que las preparaciones en base a FSH estuvieron disponibles, una serie de estudios demostraron su beneficio en comparación a la eCG pasando a ser la hormona de elección en los protocolos actuales de superovulación (Elsden et al., 1978; Monniaux et al., 1983). Los tratamientos con FSH en ovejas y cabras (y también en vacas) se basan a un régimen de 6 a 8 dosis que deben ser administradas con un intervalo de 12 h(horas) debido a su vida media corta en sangre (5 h aproximadamente) (Demoustier et al., 1988).

Si bien los tratamientos con FSH han mejorado la respuesta ovárica y la producción de embriones en varias especies, la búsqueda de tratamientos más eficaces que permitan una menor variabilidad en la respuesta ha sido un tema de investigación en las últimas décadas

(Cognié et al., 2003; González-Bulnes et al., 2004). Los tratamientos tradicionales de superovulación en ovejas consisten en la colocación de un dispositivo intravaginal liberador de progesterona por 12 a 18 días, iniciando el tratamiento con FSH 48 h antes de retirar el dispositivo (Gonzalez-Bulnes et al., 2002). Estos tratamientos fueron diseñados en la década de 1980 (Menchaca et al., 2007), por lo cual no consideran los conocimientos sobre la fisiología y dinámica ovárica generados luego de los años 1990s.

Los conocimientos acerca de las ondas y la dominancia foliculares (Ginther et al., 1995; Gonzalez de Bulnes et al., 1999; Savio et al., 1988), ayudaron a demostrar que el estatus ovárico al inicio de los tratamientos de superovulación afectaba la respuesta ovárica (Guilbault et al., 1991; Nasser et al., 1993). Si bien este fenómeno está mejor estudiado en la vaca, también en la oveja hay evidencia que indica un efecto similar. La respuesta ovulatoria está relacionada con el número de folículos sensibles a la FSH presentes en los ovarios al momento de la superovulación (Gonzalez de Bulnes et al., 2000), y la presencia de un folículo dominante al comenzar el tratamiento está relacionado con una menor población de estos folículos pequeños (sensibles a la FSH por sus receptores a la hormona en las células de la granulosa) resultando en un menor reclutamiento folicular y respuesta ovárica (Menchaca et al., 2009; Rubianes et al., 1995). Esta información dio lugar a la creación de nuevos protocolos de superestimulación ovárica, como el Protocolo Día 0 (Menchaca et al., 2009). Este protocolo sincroniza la emergencia de la primera onda folicular, sin la presencia de un folículo dominante, para esto el tratamiento empieza justamente luego de la ovulación que es estimulada por una sincronización previa. Con esta estrategia se mejoró la respuesta ovárica y la producción de embriones en programas de MOET cuando fue comparado con protocolos tradicionales que no consideran la dominancia folicular (Cuadro et al., 2018). Este protocolo ha sido comparado con el protocolo convencional mostrando mejores resultados tanto en cabras (Menchaca et al., 2007) como en ovejas (Menchaca et al., 2009). El último ajuste para este protocolo fue la implementación de una fuente exógena de progesterona (mediante el uso de un CIDR) durante el tratamiento con FSH, ya que había evidencias de que altas concentraciones de progesterona durante el desarrollo preovulatorio aumentaba la fertilidad (Nasser et al., 2011; Rivera et al., 2011). Manteniendo concentraciones de progesterona altas en ese período, con este protocolo se lograron mejores tasas de fertilización y calidad embrionaria (Cuadro et al., 2018).

Si bien este tratamiento de superovulación de la primera onda folicular ya ha demostrado claras ventajas que lo hacen favorable, la necesidad de administración de varias dosis de FSH cada 12 h sigue siendo una dificultad ya que se requiere un manejo repetido de los animales. La administración de dosis repetidas de FSH dos veces por día y durante algunos días, puede generar cierto estrés para las donantes y requiere dedicación de personal a cargo de dicha tarea. Por este motivo, la posibilidad de simplificar los tratamientos de superovulación manteniendo una respuesta satisfactoria es de mucho interés para la aplicación de los programas MOET.

2.2. Reserva ovárica: correlación con tasa ovulatoria y producción de embriones

Si bien los protocolos de superovulación han mejorado en los últimos años, la aplicación comercial de la técnica transferencia de embriones en ovejas sigue siendo afectada por la alta variabilidad en la respuesta ovulatoria (Bartlewski et al., 2016; González-Bulnes et al., 2004).

Más allá de que la presencia de folículos pequeños y sensibles a la FSH puede ser manipulada y mejorada controlando la dinámica y la dominancia folicular, la población total de folículos antrales (AFC) que posee cada hembra no son controlados por estas estrategias y requieren particular atención. Sucesivos trabajos fueron realizados demostrando que la población folicular es variable entre las hembras, y esto afecta la fertilidad y los resultados en técnicas reproductivas, principalmente la superovulación y producción de embriones (Burns et al., 2005; J. J. Ireland et al., 2007; J. L. H. Ireland et al., 2008; Jimenez-Krassel et al., 2009). En los primeros trabajos realizados en bovinos asociando número de folículos antrales con resultados en producción de embriones *in vivo* e *in vitro*, se agruparon los animales en dos grupos de comparación, bajo y alto número de folículos antrales; los resultados demostraron que los animales de alta reserva ovárica (mayor número de folículos antrales) obtuvieron mayor número de estructuras colectadas y embriones transferibles producidos *in vivo*, y mayor número de ovocitos cultivados *in vitro* que llegaron al estadio de blastocistos (Ireland et al., 2007).

Estos resultados inspiraron una serie de investigaciones (Bartlewski et al., 2016; Ireland et al., 2011; Lahoz et al., 2014; Monniaux et al., 2011; Pinto et al., 2018; Rico et al., 2009) con el propósito de acceder a la reserva ovárica a través de marcadores que posibilitarían la selección de las mejores donantes para programas de producción de embriones. La medición de hormonas circulantes y estructuras ováricas antes y durante la superovulación en ovejas son un ejemplo de marcadores de la reserva ovárica a utilizar, estos pueden proveer una indicación anticipada de la respuesta a un tratamiento hormonal de superovulación (Bartlewski et al., 2016).

2.3. Marcadores de la reserva ovárica

En las últimas décadas varios estudios han relacionado la cantidad y calidad de los folículos en el ovario a características reproductivas (Torres-Rovira et al., 2014), y la variación en la respuesta ovárica a los tratamientos de superovulación en base a FSH está afectada, al menos en parte, por la población folicular entre individuos al inicio de los tratamientos (Lahoz et al., 2014). Debido a la búsqueda de marcadores apropiados de la reserva ovárica se llevaron a cabo una gran cantidad de estudios, tanto en mujeres como en hembras de especies de producción (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2008; Rico et al., 2009). Una de las primeras técnicas para estimar la reserva ovárica fue a través del conteo de folículos antrales directo mediante ultrasonografía ovárica. Como fue indicado anteriormente, debido al fenómeno de las ondas foliculares y las diferentes fases de cada onda, este examen puede variar mucho según el estatus ovárico o el momento del ciclo de la hembra (Burns et al., 2005). Como alternativa a la estimación de la AFC, la determinación de las concentraciones de AMH

apareció como una herramienta apta ya que esta muestra menor variación durante el ciclo estral (Rico et al., 2009; Souza et al., 2015). La AMH es una glicoproteína dimérica miembro de la familia del factor de crecimiento transformante β (Rico et al., 2009), esta fue primeramente identificada por el papel que cumple en la diferenciación sexual durante el desarrollo embrionario promoviendo la regresión de los conductos de Müller en el embrión masculino, ya que estos conductos dan origen a los órganos sexuales femeninos (la Marca & Volpe, 2006). Luego fue comprobado que ejerce un efecto inhibitorio en el desarrollo y la funcionalidad de los órganos sexuales en ambos sexos (Teixeira et al., 2001), en hembras la expresión hormonal es restringida a las células de la granulosa de los folículos ováricos y la mayor expresión se encuentra en la categoría de folículos preantrales y antrales pequeños, esta expresión cae con el avance del desarrollo folicular (Baarends et al., 1995). Sobre su función en individuos adultos, está la hipótesis de que disminuye la sensibilidad de los folículos antrales a la FSH (Torres-Rovira et al., 2014), inhibiendo el reclutamiento de los folículos primordiales al pool folículos en crecimiento (Rico et al., 2011), y de esa forma se evitaría el agotamiento prematuro de la reserva ovárica (Durlinger et al., 1999; Gigli et al., 2005). Debido a las características mencionadas, fue considerada como un confiable marcador de la reserva ovárica, porque a través de su concentración se puede estimar la población de pequeños folículos antrales sensibles a gonadotrofinas (Lahoz et al., 2014). Ha sido propuesta la medición de los niveles de AMH previo a un tratamiento con FSH (Lahoz et al., 2014) para así detectar las ovejas con mayor pool de folículos sensibles a gonadotrofinas. Asimismo, se ha reportado una correlación positiva entre el número de folículos antrales pequeños al inicio de un tratamiento superovulatorio y el porcentaje de embriones producidos en ovejas (Bartlewski et al., 2016). Estos datos abren el espacio para seguir perfeccionando la técnica de selección de donantes y refinamiento de los tratamientos de superovulación, a partir de la estimación de la reserva ovárica de cada hembra y su potencial uso para predecir la respuesta o seleccionar las donantes. Aunque ya haya avances reportados en la temática, la información sobre los niveles de AMH y su relación con AFC, así como su utilización como un predictor de la respuesta a tratamientos con FSH en ovinos, es escasa en la literatura.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La superovulación y producción de embriones permite un gran aumento en la multiplicación de hembras de alto desempeño productivo y auxilia en programas de mantenimiento de especies en riesgo de extinción. En ovinos es una biotecnología que viene siendo utilizada en las últimas décadas, pero todavía presenta limitantes que dificultan su aplicación a nivel comercial. Algunas limitantes como la alta variabilidad de respuesta individual o la necesidad de administración de FSH en múltiples dosis (por ejemplo, dos veces por día durante cuatro días), hacen difícil su adopción. Sería de gran utilidad encontrar alternativas que garanticen una buena respuesta ovulatoria y producción embrionaria, así como estrategias que simplifiquen los protocolos de administración hormonal.

El Protocolo Día 0 surgió a partir de los nuevos conocimientos acerca de la dinámica y dominancia folicular, mejorando los resultados obtenidos anteriormente con protocolos

tradicionales. Este protocolo ha mostrado ventajas interesantes mejorando la respuesta ovárica y la producción de embriones, sin embargo, la variabilidad individual sigue siendo una realidad que no ha logrado resolverse por completo. Asimismo, aún sigue siendo necesaria la administración de FSH dos veces al día y por varios días, requiriendo un manejo repetido de los animales.

En los últimos años se ha avanzado con el estudio de la reserva ovárica, proponiendo que pueda ser estimada en cada individuo a través de ciertos marcadores que quizás permitan encontrar formas de reducir la variabilidad de la respuesta individual. Además, con esta información acerca de la estimación de la población folicular individual, quizás podría plantearse el ajuste de la dosis o duración del tratamiento con FSH para cada individuo mejorando así la respuesta por ejemplo en aquellas hembras con menor número de folículos. En este trabajo se buscó estimar la reserva ovárica individual y asociarlo con la variación de la longitud de tratamiento con FSH utilizando el Protocolo día 0, evaluando el efecto sobre la respuesta ovárica y la producción de embriones. Esta tesis propone un nuevo abordaje hacia la búsqueda de optimizar el uso de esta tecnología, facilitar su aplicación a nivel comercial, y de esa forma seguir avanzando para mejorar la eficiencia reproductiva y el avance genético que las biotecnologías de la reproducción permiten.

Hipótesis

La reserva folicular está asociada con la producción de embriones y la respuesta a la superovulación puede ser manipulada por el largo del tratamiento con FSH.

Objetivo General

Evaluar la relación entre el conteo de folículos antrales y los niveles séricos de la hormona antimulleriana y como estimación de la reserva folicular, y comparar el efecto de dos protocolos de superovulación de 6 vs. 8 dosis de FSH sobre la tasa ovulatoria y la producción de embriones.

Objetivos específicos

1. Evaluar la utilización de AFC y los niveles séricos de AMH como marcadores de la reserva ovárica y de la respuesta a la superovulación.
2. Evaluar el efecto de la longitud del tratamiento superovulatorio (6 vs 8 dosis) en la respuesta ovulatoria, en el número de embriones y en la calidad embrionaria.
3. Evaluar el efecto de la longitud de tratamiento en animales con diferentes niveles de reserva ovárica y séricos de AMH.

4. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Para evaluar y relacionar AFC y concentraciones séricas de AMH con los resultados de un tratamiento superovulatorio con FSH se trabajó en la superovulación de la primera onda folicular (Protocolo Día 0) con dos longitudes de tratamiento de 6 y 8 dosis de FSH.

Las donantes recibieron el tratamiento con FSH en 6 u 8 dosis decrecientes, administradas por vía intramuscular cada 12 h, con una dosis total de 240 mg de FSH en ambos tratamientos. El día 0 del experimento fue definido como el día en que se administró la primera dosis de FSH. En el día - 9 y en el día 0 del experimento se colectaron muestras sanguíneas para análisis de AMH y se realizó una ultrasonografía ovárica con el objetivo de estimar la población folicular y clasificar las donantes en alta o baja reserva ovárica. Esos momentos de análisis fueron estratégicamente organizados para que la población folicular fuera estudiada en un momento desconocido del estadio ovárico del animal (Día - 9), e inmediatamente luego de la ovulación coincidiendo con la fase de reclutamiento folicular al inicio de una nueva onda (primera onda folicular).

Luego del tratamiento de superovulación se realizó la inseminación artificial, y seis días más tarde se evaluó la respuesta ovárica mediante el número de cuerpos lúteos por laparoscopia, así como la producción de embriones mediante el número de estructuras colectadas, estructuras fertilizadas, embriones transferibles y congelables por donante. Se realizó una colecta embrionaria quirúrgica y la evaluación morfológica de los embriones fue realizada de acuerdo con las normas recomendadas por la *International Embryo Transfer Society* (IETS; Stringfellow & Givens 2010).

Para acceder a los valores de AMH sérica, se realizaron evaluaciones de los niveles séricos en laboratorio con la técnica ELISA para la medición hormonal. Para el AFC, fue elaborado un mapa ovárico al momento de las ultrasonografías ováricas, el cuál fue corroborado nuevamente a partir de grabaciones de los exámenes ultrasonográficos por el mismo operador.

Se evaluaron la correlación entre respuesta ovulatoria y producción de embriones con los valores de AFC y AMH; los resultados de respuesta ovulatoria y producción de embriones según la longitud del tratamiento de FSH y por último fueron comparados los resultados de las dos longitudes de tratamiento de FSH luego de agrupar los animales según sus niveles de AMH, bajos o altos (utilizando estos valores como marcadores del tamaño de la reserva ovárica individual).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Animales y manejo

Este estudio fue realizado en la estación experimental *Eastern Agricultural Research Station* (*The Ohio State University*, Caldwell, Ohio, EE. UU., 39°N) durante enero y febrero en la transición de la estación reproductiva a la estación de anestro en el hemisferio norte. Todos los procedimientos fueron conducidos bajo la aprobación de *Institutional Animal Care Use Committee of the Office of Research at The Ohio State University* (protocolo 2019A00000096; Ohio, EE. UU.). Se utilizaron 63 ovejas multíparas Poll Dorset y cruce Poll Dorset x Suffolk con una condición corporal (media \pm SEM) de $2,7 \pm 0,1$ (escala: 0 emaciado; 5 obesa), $58,5 \pm 1,5$ kg de peso vivo, y $3,2 \pm 0,2$ años. Los animales se mantuvieron en un galpón y fueron alimentados diariamente con concentrado (media 0,45 kg/oveja), heno y agua ad libitum.

5.2. Tratamiento hormonal e inseminación artificial

Todas las ovejas recibieron un tratamiento de superestimulación ovárica durante la primera onda folicular, Protocolo Día 0 (Menchaca et al., 2010). Durante el protocolo, la FSH fue administrada luego de estimada la ovulación, lo que requiere una sincronización previa usando un protocolo que consiste en 0,3 g de progesterona administrada en un dispositivo intravaginal (Eazi-Breed CIDR, Zoetis, Auckland, New Zealand) por 6 días. Este protocolo incluye una dosis de eCG y otra de prostaglandina (PG) F2 α administradas por vía intramuscular (i.m.) al momento del retiro del dispositivo con progesterona. Debido a que la eCG no está disponible comercialmente en EE. UU. y la única presentación es combinada con hCG (gonadotrofina coriónica humana), la administración de eCG en este caso fue asociada con hCG (200/100 IU, respectivamente, P.G. 600, Merck, Darmstadt, Alemania). La administración de PGF2 α consistió en el uso de 125 μ g de cloprostenol sódico (EstroPLAN, Parnell, Alexandria, Australia) en el momento del retiro del CIDR, al día -3 del experimento. Para sincronizar la ovulación se realizó la administración i.m. de 100 μ g de acetato de gonadorelina (GnRH; GONAbreed, Parnell, Sydney, Australia) 36 h después de la remoción del CIDR. De acuerdo con reportes anteriores, con este protocolo la ovulación ocurre 72-84 h luego de la remoción del dispositivo en aproximadamente el 80 a 90% de las ovejas (Vilariño et al., 2013) o cabras tratadas (Menchaca et al., 2007).

Luego de este tratamiento de sincronización de la ovulación, se administró el tratamiento superestimulador. Este fue iniciado 84 h luego de la remoción del dispositivo intravaginal y consistió en la administración de 240 mg de FSH (12 ml de Folltropin, Vetoquinol, Lavaltrie, Canada). La dosis total de FSH fue administrada en 6 dosis decrecientes (grupo 6-dosis, n=30) o en 8 dosis decrecientes (grupo 8-dosis, n=33), siendo inyectada en ambos grupos con una frecuencia de dos veces al día (7:00 y 19:00) de acuerdo con el siguiente esquema. Grupo de 6 dosis: 3, 3, 2, 2, 1, 1 mL; Grupo de 8 dosis: 2,5, 2,5, 1,8, 1,8, 1,2, 1,2,

0,5, 0,5 mL. Con el objetivo de mantener niveles altos de progesterona durante el tratamiento de FSH, las ovejas recibieron un CIDR desde la primera dosis de FSH hasta la sexta y octava dosis de FSH, en los grupos de 6-dosis y 8-dosis, respectivamente (Cuadro et al., 2018). Dos dosis de PGF2 α (125 μ g cloprostenol sódico) fueron administradas con las dos últimas dosis de FSH para inducir la luteólisis. Una dosis de 100 μ g de GnRH fue administrada 12 h después de la última dosis de FSH con el propósito de sincronizar el pico preovulatorio de LH y la ovulación aumentando la tasa de fertilización y producción de embriones (Menchaca et al., 2009). La inseminación intrauterina por laparoscopia fue realizada 16 h luego de la administración de GnRH utilizando semen fresco (100×10^6 espermatozoides por oveja). Previo al procedimiento se administró un sedante (0,1 mg/kg xilacina, i.m., AnaSed, Akorn, Lake Forest, EE. UU.) y un agente analgésico (0,05 mg/kg butorfanol, Torbugesic, Zoetis, Alcobendas, España) i.m., y al finalizar el procedimiento las ovejas recibieron un antibiótico (5 mg/kg ceftiofur, Excede, Zoetis, Kalamazoo, EE. UU.). El protocolo de superestimulación y el diseño experimental se muestran en la Figura 1.

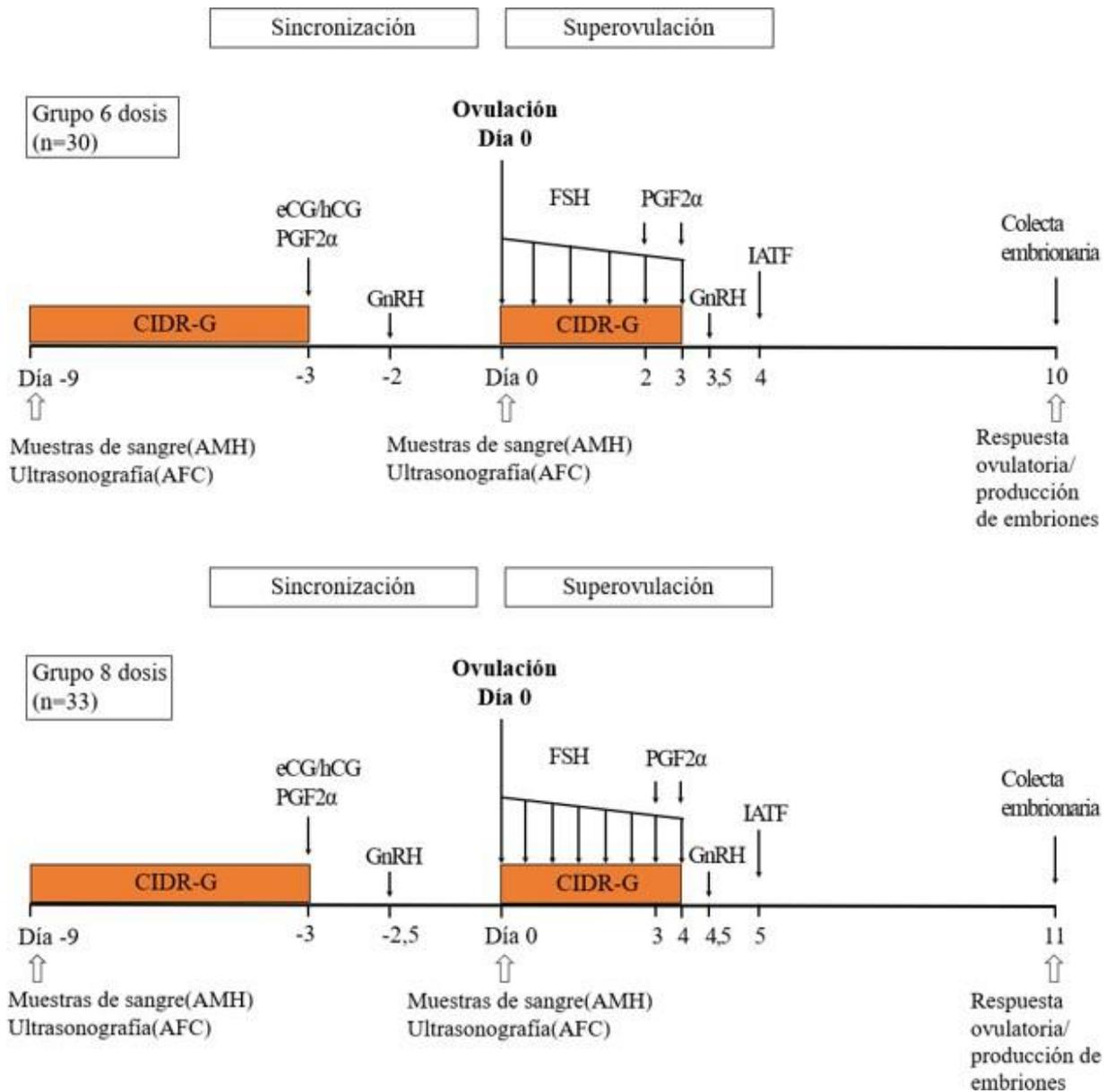


Figura 1. Diseño experimental para evaluar el uso de AFC y AMH como marcadores de la reserva ovárica, y el efecto de la longitud del tratamiento superovulatorio sobre la producción de embriones. La FSH fue administrada en 6 dosis (cuadro superior) u 8 dosis (cuadro inferior) decrecientes, con una dosis total de 240 mg. El Día 0 fue definido a las 84 h de la remoción del dispositivo de progesterona intravaginal (tipo CIDR) que se utilizó durante el protocolo previo de sincronización.

5.3. Conteo de folículos antrales

Fueron realizadas exámenes ováricos luego de la extracción sanguínea en los días -9 y 0 del experimento. Los ovarios fueron examinados por ultrasonografía transrectal con una sonda lineal de 9.6 MHz (MyLab-DeltaVET, Esaote, Genova, Italia) acoplada a un soporte

de plástico ligeramente arqueado para facilitar la manipulación externa. En los dos momentos ambos ovarios fueron examinados, y el diámetro y la posición de todos los folículos antrales $\geq 1,5$ mm fueron registrados en un mapa ovárico y grabados en formato de video que luego fue chequeado por el mismo operador para confirmar dichos registros.

5.4. Muestras de sangre para análisis de AMH

El muestreo sanguíneo fue realizado en la mañana del día de la colocación del dispositivo intravaginal de progesterona para la presincronización (ej. 9 días antes de la administración de FSH, Día -9) y en el día de la primera dosis de FSH (Día 0). Las muestras fueron colectadas por punción de la vena yugular utilizando tubos con vacío (BD Vacutainer Serum Tubes, Becton Dickison, Franklin Lakes, EE. UU.), luego mantenidas por dos horas a temperatura ambiente y posteriormente, refrigeradas en heladera. Luego, las muestras fueron centrifugadas en 3500 RPM durante trece minutos a 5 °C, el suero fue separado de la fracción celular y conservado a -20 °C hasta el día del análisis. La determinación de las concentraciones séricas de AMH fue realizada con un kit ELISA de AMH específico para ovinos (AnshLabs, Webster, Texas, EE. UU.), tipo ELISA sándwich cuantitativo de tres pasos. Una curva de calibración fue determinada desde 0,0 ng/mL a 24 ng/mL. Las muestras de suero fueron descongeladas a temperatura ambiente, procesadas en un vortex y centrifugadas para remover cualquier fragmento celular que pudiera interferir con los resultados del ensayo. El control de calidad se realizó en un pool de muestras para cada placa de análisis hormonal. En la primera incubación se agregaron 50 μ l de muestras de suero y calibradores diluidos en serie a los pocillos de micro titulación de AMH recubiertos de anticuerpos, incubándose durante 120 minutos. La segunda incubación fue de 60 minutos con el conjugado de anticuerpo-biotina. Como tercera incubación se agregó la enzima Streptavidina conjugada a cada pocillo por 30 minutos. Como último paso se hizo la adición de la solución cromógena de TMB por 10 minutos e inmediatamente luego de esta última incubación se utilizó una solución de finalización de reacción. Entre cada incubación la placa fue lavada en una lavadora de microplacas con una solución de lavado específica. Entre 20 minutos fue leída la absorbancia de la solución a 450 nm usando una lectora de placas (SpectraMax Plus384, Molecular Devices LLC, San Jose, CA, EE. UU.). El límite de detección de la muestra fue de 0,025 ng/mL, los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron 2,6% y 5,8%, respectivamente.

5.5. Respuesta ovárica y colecta embrionaria

La respuesta ovárica fue determinada por laparoscopia 6 días luego de la inseminación, y en ese momento se realizó la recuperación embrionaria en aquellas hembras que respondieron al tratamiento (*i.e.*, ovejas con más de dos CL). Para evitar una cirugía innecesaria a aquellas donantes que no respondieron al tratamiento, el lavado uterino no se realizó en los animales con dos o menos CL o con un cuerpo lúteo de regresión temprana (ERCL, por su sigla en inglés). Previo a la cirugía los animales recibieron una sedación/analgesia con xilacina (0,15 mg/kg, AnaSed, Akorn, Lake Forest, EE. UU.), mientras que la anestesia general fue inducida con ketamina (2 mg/kg, *i.v.*, Ketathesia, Henry Schein, Dublin, Irlanda) y midazolam (0.2 mg/kg, USP, North Bethesda, EE. UU.), y mantenida con una mezcla de isoflurano (2-3%, Fluriso, VetOne, Chennai, India) y oxígeno administrado por vía inhalatoria. Luego del procedimiento, fueron administrados antibiótico (5 mg/kg ceftiofur, Excede, Zoetis, Kalamazoo, EE. UU.) y antiinflamatorio (1,2 mg/kg flunixin meglumine, Prevail, VetOne, Boise, EE. UU.).

La colecta embrionaria se realizó mediante vía quirúrgica de acuerdo con las recomendaciones de IETS (Menchaca and Hunton, 2020), a través de una incisión paramediana (5 cm de longitud) craneal a la ubre para acceder al tracto reproductivo. Cada cuerno uterino fue lavado con 35 mL de medio de lavado (Complete Flush, VIGRO, Vetoquinol, Lavaltrie, Canadá) utilizando un catéter intravenoso de 18 G insertado cerca de la unión útero-tubárica y el contenido del lavado fue recuperado en una placa de Petri de 90 mm con un catéter 8 F Foley colocado en la bifurcación externa de los cuernos uterinos. Las estructuras colectadas fueron evaluadas bajo microscopia estereoscópica y clasificadas de acuerdo con las recomendaciones de la IETS (Stringfellow & Givens, 2010). La calidad de los embriones fue evaluada de acuerdo con el siguiente criterio: grado 1 (excelente o bueno), grado 2 (medio), grado 3 (pobre), y grado 4 (muerto o degenerado). Grados 1 a 3 fueron considerados como embriones transferibles, y grados 1 y 2 fueron considerados como embriones adecuados para la criopreservación (embriones congelables).

5.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa SAS, versión 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.E.U.U). Para cada animal se recopiló la siguiente información: AFC y AMH en etapa desconocida de ciclo estral (Día -9), AFC y AMH en la emergencia de la onda (Día 0), número de CL y embriones producidos al día de la colecta embrionaria, número de CL en la colecta de embriones. La evaluación de las correlaciones entre AFC, AMH, la respuesta ovárica y la producción de embriones se realizó con el coeficiente de correlación de Pearson. El análisis de las posibles diferencias entre los grupos de tratamientos se realizó utilizando Modelos Lineales Generalizados y Mixtos con el procedimiento GLIMMIX. El modelo incluyó el tratamiento (6 vs 8 dosis) como efecto fijo, mientras que el corral en que se encontraban las ovejas (7 corrales) se incluyó como efecto aleatorio. En una primera etapa del análisis (ver Tabla 1), se incluyeron todos los animales para evaluar la respuesta a los tratamientos (6 vs 8 dosis). Un segundo análisis fue realizado para evaluar el efecto de la duración del tratamiento según los niveles de las concentraciones séricas de AMH. En esta

segunda etapa del análisis se dividió a la población de donantes en terciles según la concentración de AMH, seleccionando finalmente los dos grupos contrastantes (Baja AMH; con <7 ng/mL, $n = 23$; o Alta AMH; > 10 ng/mL, $n = 22$). Las diferencias estadísticas fueron definidas para un nivel de significancia de $P < 0,05$, y se consideró como tendencia estadística cuando $P > 0,05$ y $P < 0,10$. Los datos se presentan como medias \pm SEM.

6. RESULTADOS

6.1. Conteo de folículos antrales

El número de folículos totales al Día -9 del tratamiento fue $4,1 \pm 0,2$, mientras que al Día 0 fue $5,7 \pm 0,3$ ($P < 0,05$). Similarmente, el número de folículos antrales pequeños (<4 mm) fue significativamente inferior ($P < 0,05$) al Día -9 ($3,5 \pm 0,2$) que al Día 0 ($5,3 \pm 0,3$). Los valores de correlación entre el número de folículos <4 mm al Día -9 y diferentes variables al momento de la colecta de embriones fueron: número de cuerpos lúteos ($r = 0,22$, $P < 0,10$), estructuras totales ($r = 0,27$, $P < 0,05$) y número de embriones fertilizados ($r = 0,27$, $P < 0,05$, Figura 3). Una tendencia a una correlación positiva entre el número de folículos <4 mm y AMH al Día -9 fue detectada ($r = 0,23$; $P < 0,10$, Figura 2), mientras que para el número de folículos totales y la AMH la correlación no fue significativa.

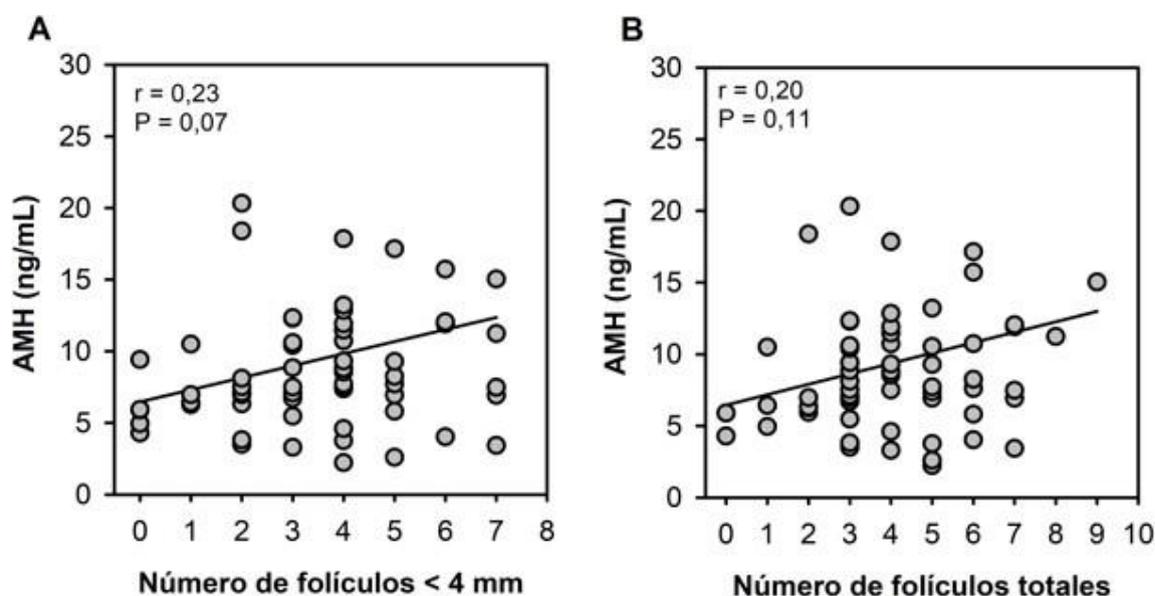


Figura 2. Correlación entre AFC y las concentraciones séricas de AMH en un momento desconocido del estatus ovárico (Día -9 del experimento). Las gráficas representan los valores de correlación para: folículos <4 mm de diámetro (cuadro A) y número de folículos totales (cuadro B) con los valores séricos de AMH (ng/mL). Cada punto en las gráficas representa una donante, todas las donantes fueron consideradas en el análisis, pero una donante que presentó valores de AMH de 53,4 ng/ml no figura en las gráficas a modo de facilitar la visualización de la gráfica.

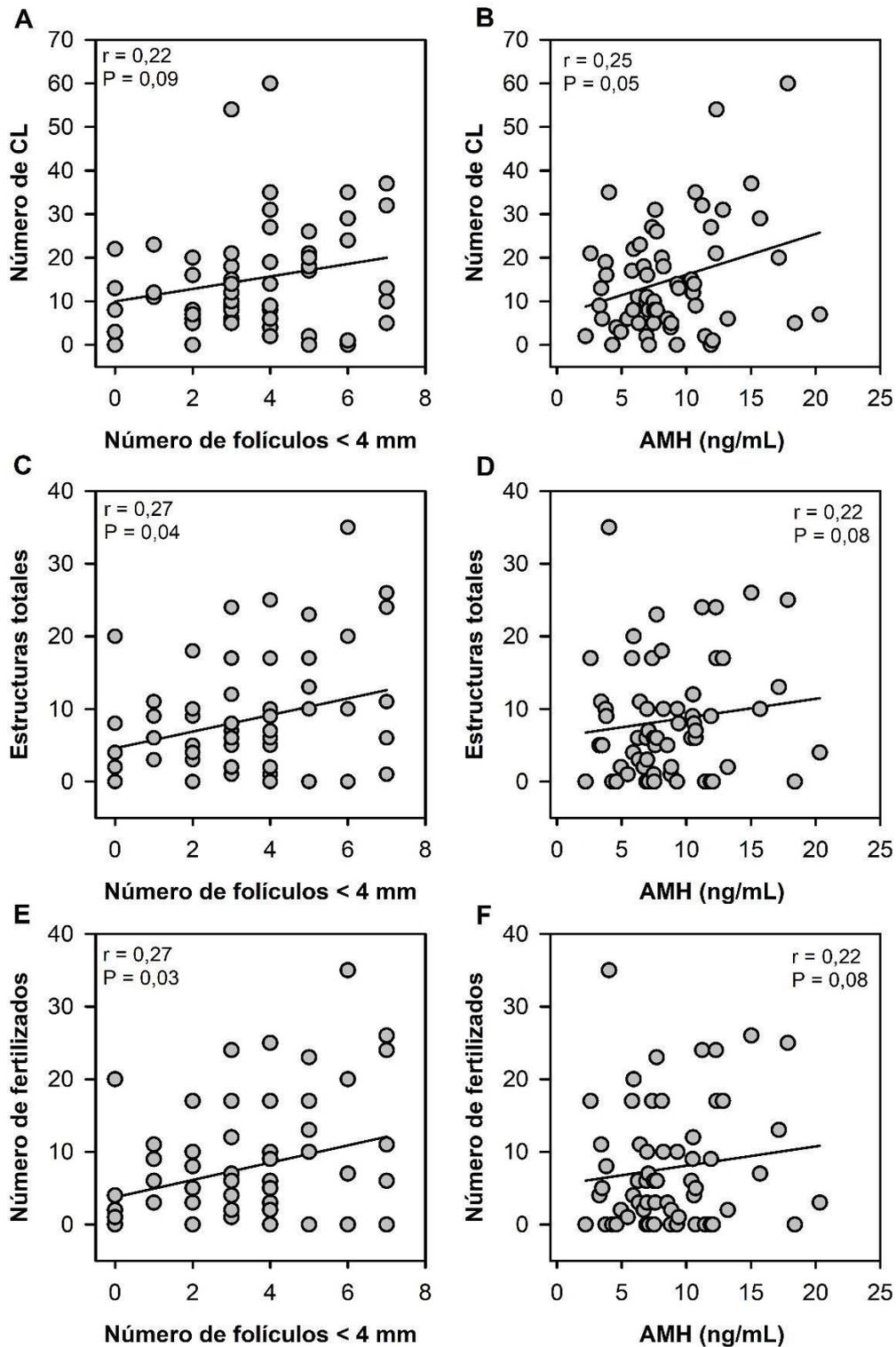
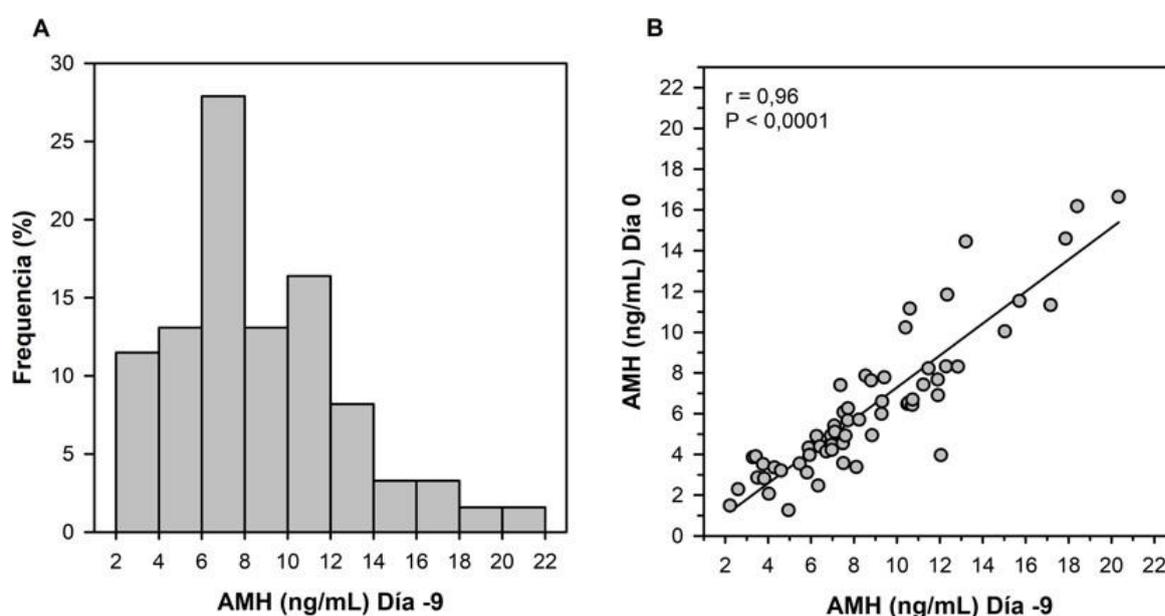


Figura 3. Correlación entre el número de folículos antrales <4mm o los niveles séricos de la hormona antimulleriana en un momento desconocido del estatus ovárico y diferentes variables determinadas al día de la colecta de embriones: (A-B) número de cuerpos lúteos, (C-D) estructuras totales colectadas y (E-F) número de fertilizados. Cada punto en las gráficas representa a una donante, todas las donantes fueron consideradas en el análisis, pero para facilitar la visualización una donante que presentó valores de AMH de 53,4 ng/ml no figura en las gráficas.

6.2. Concentraciones séricas de AMH

Los valores séricos de AMH en un momento desconocido del estatus ovárico y a la primera dosis de FSH fueron de $9,4 \pm 0,9$ y $6,8 \pm 0,7$ ng/ml ($P < 0,05$), respectivamente. Los valores individuales entre los dos muestreos fueron altamente correlacionados ($r = 0,96$; $P < 0,0001$, Figura 4). Con respecto a la correlación entre los niveles séricos de AMH al Día -9 y las variables de respuesta al tratamiento y producción de embriones, se encontró una correlación positiva con el número de cuerpos lúteos totales y tendencias para número de estructuras totales y número de fertilizados ($r = 0,25$, $P = 0,05$; $r = 0,22$, $P < 0,10$; $r = 0,22$, $P < 0,10$; respectivamente, Figura 3).



6.3. Respuesta ovárica y producción de embriones en ovejas tratadas con 6 vs 8 dosis de FSH

El análisis inicial evaluó el efecto de la duración del tratamiento con FSH en todas las ovejas. El porcentaje de donantes que respondieron al tratamiento (ej., animales con más de 2 CL/donantes totales) no fue diferente entre tratamientos ($P = NS$). Se observó una tendencia ($P <$

0,10) a una respuesta ovulatoria menor en las ovejas tratadas con un régimen de 6 dosis contra el régimen de 8 dosis ($14,2 \pm 1,7$; $20,3 \pm 2,8$, respectivamente). Ninguna diferencia significativa fue detectada entre tratamientos para las variables: estructuras totales, número de fertilizados, embriones transferibles y congelables ($P = \text{NS}$; Tabla I).

Tabla I. Respuesta ovulatoria y producción de embriones en ovejas que recibieron un tratamiento de superovulación con 6 vs 8 dosis de FSH. Los datos se presentan como medias \pm SEM.

	Tratamiento		Valor P
	6 dosis (n = 30)	8 dosis (n = 33)	
Respuesta ovárica			
Respuesta de donantes (%) *	93,3% (28/30)	78,8% (26/33)	0,54
Número de CL por donante	$14,2 \pm 1,7$	$20,3 \pm 2,8$	0,06
Folículos anovulatorios por donante	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	0,96
Producción embrionaria**			
Número de estructuras colectadas	$9,0 \pm 1,3$	$10,9 \pm 1,8$	0,38
Estructuras no fertilizadas	$0,9 \pm 0,4$	$0,7 \pm 0,3$	0,39
Número de fertilizados	$8,1 \pm 1,4$	$10,2 \pm 1,9$	0,34
Porcentaje de fertilizados/ embriones colectados	90,4% (227/251)	93,7% (266/284)	0,17
Degenerados	$1,3 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,8$	0,89
Embriones transferibles	$6,8 \pm 1,2$	$8,2 \pm 1,8$	0,52
Porcentaje de transferibles/ fertilizados	84,1% (191/227)	80,5% (214/266)	0,29
Número de embriones congelables***	$6,6 \pm 1,1$	$8,2 \pm 1,8$	0,43
Porcentaje de congelables/ fertilizados	81,1% (184/227)	80,5% (214/266)	0,86

*Porcentaje de donantes con más de dos cuerpos lúteos (CL). Donantes con ≤ 2 CL o cuerpo lúteo de regresión temprana no fueron incluidas para los análisis de las demás variables.

**Las variables de producción de embriones fueron calculadas por donante

***Los embriones congelables son los de grado 1 y 2 según la clasificación utilizada.

Todas las variables de producción de embriones fueron calculadas por donante.

6.4. Longitud de tratamiento de FSH en grupos de Baja y Alta AMH

Para evaluar el efecto de la duración del tratamiento de superovulación en ovejas con diferentes niveles de AMH al Día -9 (al tomar la AMH como un marcador de la reserva ovárica), se realizó un segundo análisis para contrastar ovejas con baja (< 7 ng/mL) o alta AMH sérica (> 10 ng/mL) y los resultados se presentan en la Tabla 2.

En aquellas ovejas con niveles bajos de AMH, el porcentaje de donantes que respondieron al tratamiento no fue diferente ($P = NS$) entre los animales tratados con 6 u 8 dosis. De manera similar, en estas ovejas con bajos niveles de AMH no hubo diferencia significativa ($P = NS$) en el número de CL ni en el número de estructuras colectadas por donante entre un régimen de 6 u 8 dosis de FSH. El número de estructuras no fertilizadas tendió ($P < 0,1$) a ser mayor con el tratamiento de 6 dosis que con el tratamiento de 8 dosis. Para estas ovejas con bajos niveles de AMH, el número de estructuras fertilizadas, porcentaje de fertilizados/estructuras colectadas, el número de embriones transferibles (calidad grado 1 a 3) y congelables (calidad grado 1 y 2) por donante fueron menores ($P \leq 0.05$) para ovejas a las que se les administró FSH en 6 dosis en comparación con un régimen de 8 dosis. El número de donantes que produjeron más de 2 embriones transferibles presentó una tendencia a ser mayor para el tratamiento de 8 dosis ($P < 0,1$). No se observaron diferencias ($P = NS$) entre los grupos de tratamiento para el número de embriones degenerados ni el porcentaje de embriones congelables en ovejas de baja AMH.

En aquellas ovejas que mostraron altos niveles de AMH, no se detectaron diferencias significativas ($P = NS$) en el número de CL ni en la producción de embriones entre las ovejas del tratamiento de 6 dosis o de 8 dosis.

Tabla II Respuesta ovulatoria y producción de embriones en ovejas con baja (<7 ng/mL) o alta (>10 ng/mL) AMH sérica con tratamientos de superovulación de 6 vs 8 dosis de FSH. Los datos se presentan como medias \pm SEM.

	Baja AMH			Alta AMH		
	6 dosis (n = 10)	8 dosis (n = 13)	Valor P	6 dosis (n = 10)	8 dosis (n = 12)	Valor P
AMH (ng/mL)	5,7 \pm 0,4	4,6 \pm 0,5	0,09	14,5 \pm 1,2	12,2 \pm 0,7	0,07
Respuesta de donantes (%) *	90,0% (9/10)	84,6% (11/13)	0,07	90,0% (9/10)	83,3% (10/12)	0,65
Número de CL por donante	10,4 \pm 2,0	13,3 \pm 2,8	0,48	15,2 \pm 3,8	25,1 \pm 5,4	0,16
<i>Producción embrionaria**</i>						
Número de estructuras colectadas	4,7 \pm 1,2	10,0 \pm 2,8	0,10	9,8 \pm 2,8	11,7 \pm 2,6	0,69
Número de estructuras no fertilizadas	1,1 \pm 1,0	0,1 \pm 0,1	0,09	0,3 \pm 0,2	1,1 \pm 0,6	0,33
Número de estructuras fertilizadas	3,6 \pm 1,1	9,9 \pm 2,8	0,05	9,5 \pm 2,9	10,7 \pm 2,8	0,82
Porcentaje de fertilizados/estructuras colectadas	76,6% (36/47)	99,2% (129/130)	0,001	96,9% (95/98)	90,8% (128/141)	0,07
Embriones degenerados	0,9 \pm 0,5	1,5 \pm 1,2	0,57	1,7 \pm 0,9	2,4 \pm 1,1	0,71
Número de embriones transferibles***	2,7 \pm 0,9	8,4 \pm 2,8	0,05	7,8 \pm 2,4	8,3 \pm 2,5	0,92
Porcentaje de transferibles/fertilizados	75,0% (27/36)	84,5% (109/129)	0,19	82,1% (78/95)	77,3% (99/128)	0,39

Donantes con > 2 embriones transferibles	30% (3/10)	69.2% (9/13)	0,08	60% (6/10)	58.3% (7/12)	0,94
Número de embriones congelables ****	2,7 ± 0,9	8,4 ± 2,8	0,05	7,3 ± 2,2	8,3 ± 2,5	0,82
Porcentaje de congelables/fertilizados	75% (27/36)	84,5% (109/129)	0,19	78,2% (79/101)	77,3% (99/128)	0,87

* *Porcentaje de donantes con más de dos cuerpos lúteos (CL). Donantes con ≤ 2 CL o cuerpo lúteo de regresión temprana no fueron incluidas para los análisis de las demás variables.*

** *Las variables de producción embrionaria fueron calculadas por donante*

*** *Los embriones transferibles son los de grado 1 a 3 según clasificación utilizada*

**** *Los embriones congelables son los de grado 1 y 2 según clasificación utilizada*

7. DISCUSIÓN

Una de las preguntas que aborda esta tesis de mayor interés para aquellos veterinarios que aplican la tecnología MOET, es acerca de la conveniencia de aplicar en las donantes un régimen de 6 dosis o de 8 dosis de FSH. En un primer análisis que surge de la comparación de todas las donantes tratadas con el régimen de 6 u 8 dosis, no se encontraron diferencias importantes en la producción de embriones. La única variable en la que hubo una tendencia a un valor superior para el tratamiento de 8 dosis fue el número de CL. Considerando estos resultados, parece apropiado el uso de protocolos con menor cantidad de dosis tal como ha sido reportado por varios grupos de investigación en reproducción ovina que utilizan 6 dosis decrecientes de FSH dos veces al día en tratamientos convencionales de 14 días de progesterona (Bruno-Galarraga et al., 2014; Forcada et al., 2011; Gibbons et al. 2010). Diversos trabajos han tenido como objetivo la simplificación del número de dosis de FSH, como, por ejemplo, la reducción a una sola dosis por medio de vehículos de liberación lenta como el hialuronano o el vehículo de polivinilpirrolidona (Dattena et al., 1994; Simonetti et al., 2008; Tríbulo et al., 2012). Sin embargo, la administración de 8 dosis, la frecuencia de dos dosis por día, y la administración en dosis decrecientes de FSH siguen siendo las más utilizadas. Esto se debe a que existe un concepto bastante extendido de que se requiere una exposición a la FSH de una duración determinada, a que la FSH tiene una vida media en sangre relativamente corta, y que se pretende simular un perfil de exposición natural a la hormona FSH durante la fase folicular de un ciclo estral no estimulado (González de Bulnes et al., 2004; Menchaca et al., 2010). Considerando los resultados obtenidos en esta tesis, estos conceptos podrían ser cuestionados, o al menos podemos sugerir que no todas las donantes responden de la misma manera y requieren un solo régimen de tratamiento con FSH. Para llegar a esta sugerencia, fue necesario profundizar primero en la relación entre AFC y AMH con la repuesta superovulatoria y la producción de embriones, y en un segundo análisis

avanzar sobre el efecto de la duración del tratamiento con FSH en hembras con distinta reserva ovárica.

El análisis realizado de AFC y los niveles hormonales de AMH como posibles marcadores de la reserva ovárica y de la respuesta a la superovulación, permitió encontrar asociaciones de interés para la comprensión de la respuesta en los programas MOET. Las concentraciones séricas de AMH estuvieron altamente correlacionadas entre los dos momentos de muestreo: tanto en un momento desconocido del ciclo estral (Día -9 del experimento), como al momento de la emergencia de una nueva onda folicular al iniciar el tratamiento con FSH (Día 0 del experimento). Los resultados indican que los valores son muy variables entre los individuos, tal como fue reportado previamente en mujeres y en otras hembras de especies de producción incluidas las ovejas (Cook et al., 2000; Lahoz et al., 2014; Monniaux et al., 2011; Mossa et al., 2017; Rico et al., 2009). De acuerdo con estos reportes anteriores, las concentraciones hormonales siguen un patrón de alta variabilidad entre individuos y esta diferencia se mantiene en diferentes momentos de la actividad ovárica. En este estudio, las concentraciones de AMH luego de la sincronización estral fueron significativamente inferiores en comparación con el análisis realizado antes de la intervención hormonal al Día -9 del experimento. En un estudio que evaluó la regulación de la producción de la AMH en vacas en diferentes niveles (endócrino, ovárico y folicular), se monitorearon los animales durante un ciclo estral completo (Rico et al., 2011) y fue reportado que luego del estro ocurre una disminución en las concentraciones plasmáticas de AMH. Esto podría estar relacionado con un posible efecto inhibitorio de la hormona FSH, considerando que sus concentraciones se elevan alrededor de la ovulación justo previo al inicio de la primera onda folicular del ciclo estral. Esto coincide con lo descrito en ratones (Baarends et al., 1995) donde se demostró el efecto inhibitorio de la FSH en la expresión de la AMH en las células de la granulosa de folículos preantrales y antrales pequeños. Estos investigadores demostraron el efecto inhibitorio de la FSH sobre la secreción de la AMH al tratar células de la granulosa de folículos secretores cultivadas in vitro con FSH. En las hembras, la expresión de AMH se limita a las células de la granulosa de los folículos en el ovario, los folículos preantrales y antrales pequeños tienen la expresión más alta que luego desciende a medida que avanza el desarrollo folicular (Baarends et al., 1995; Rico et al., 2009). Los valores de AFC y AMH fueron considerados como marcadores de la reserva ovárica, primero para mujeres y ratones (Kevenaar et al., 2006; Visser et al., 2006), y posteriormente para especies productivas (Lahoz et al., 2014; Monniaux et al., 2011; Mossa et al., 2017; Rico et al., 2009). Los resultados encontrados en esta tesis son de interés para la comprensión de los perfiles de AMH en la oveja: a) para una misma hembra existe una correlación positiva en los niveles de AMH en diferentes momentos del ciclo (repetibilidad), y b) los niveles son algo más bajos al inicio de la primera onda folicular que cuando se determinan en un momento no conocido del ciclo estral.

Los resultados de esta tesis demuestran que existe una relación positiva entre el número de folículos antrales <4 mm de diámetro y las concentraciones séricas de AMH. Esta relación positiva fue demostrada en diferentes especies. En las cabras el número de folículos de 1 a 5 mm de diámetro se correlacionó altamente con los valores de AMH ($r=0,89$; $P < 0.001$; Monniaux et al., 2011); en vacas, el número de folículos de 3 a 5 mm de diámetro se

correlacionó con las concentraciones de AMH ($r = 0,71$; $P < 0.002$; Rico et al., 2011); y en ovejas, se demostró que los folículos de 1 a 3 mm contienen una mayor concentración de AMH que los folículos más grandes (Monniaux et al., 2013). Los estudios en ovejas que han reportado la relación entre AFC y la AMH son bastante escasos, y los niveles de esa relación parecen ser bastante variables según lo publicado hasta la actualidad. En corderas de aproximadamente 40 días de edad, la correlación entre la AMH y los folículos $\geq 2\text{mm}$ fue de 0,94 ($P < 0.01$) (Torres-Rovira et al., 2014). En ovejas adultas esta correlación fue relativamente más baja ($r=0,3$; $P < 0.01$) (Lahoz et al., 2014). En el experimento de esta tesis, la correlación entre AMH y el número de folículos totales no fue significativa, lo que sostiene la idea de que la fuente primaria de AMH son los folículos antrales pequeños. En el presente estudio preferimos utilizar los valores hormonales y ecográficos tomados en un momento aleatorio del ciclo estral (en este caso al Día - 9 del tratamiento), previo al tratamiento hormonal. Aunque otros investigadores se han enfocado en utilizar resultados obtenidos en un momento predefinido del ciclo estral para analizar los marcadores de la reserva ovárica (Pinto et al., 2018; Rico et al., 2011), en esta tesis se prefirió hacerlo en un momento aleatorio del ciclo estral dado que esto tendría una mayor facilidad para aplicarlo en la práctica en futuras donantes para realizarlo en cualquier momento sin necesidad de sincronizar el celo.

Con respecto a la diferencia entre los valores de las concentraciones séricas de AMH encontrados en esta tesis y lo reportado en la bibliografía disponible actualmente, sabemos que las concentraciones de esta hormona pueden variar bastante entre especies y entre razas (Monniaux et al., 2013; Mossa et al., 2017), pero es poco probable que estas diferencias tan marcadas sean únicamente atribuibles a estos dos factores. Hasta la actualidad se han desarrollado múltiples ensayos para determinar las concentraciones de AMH, y la mayoría utiliza un formato de ELISA tipo sándwich con dos anticuerpos que identifican epítomos distintos. Curiosamente, la mayoría de los estudios que informan sobre la AMH en ovejas han utilizado una de las dos iteraciones del ensayo humano AMH Gen de Beckman, mientras que el presente estudio empleó un ensayo específico para AMH ovina. La AMH es una glicoproteína secretada como un homodímero covalentemente unido (proAMH), que posteriormente se divide en la forma bioactiva compuesta por el dominio proterminal N-terminal y el dominio maduro C-terminal que permanecen como un complejo no covalentemente unido (Cate, 2022; Moolhuijsen & Visser, 2020). Además, parece que existen múltiples sitios de escisión que podrían dar lugar a diferentes isoformas (Moolhuijsen & Visser, 2020). El ensayo AMH Gen comúnmente utilizado detecta tanto el proAMH como el complejo no covalente de AMH bioactivo en el suero humano (Pankhurst et al., 2014), y las referencias indican que la forma proAMH es la más prevalente (~62%) que se encuentra en circulación (Pankhurst et al., 2014). La ubicación de los sitios de unión de los anticuerpos utilizados en los ensayos comerciales y la composición de las formas de AMH en circulación en las especies ganaderas siguen siendo en gran parte desconocidas. Por lo tanto, es plausible que las diferencias en los sitios de unión entre los ensayos y la prevalencia de las formas de AMH puedan llevar a una gran variación en las concentraciones de AMH al utilizar ensayos desarrollados para diferentes especies. Además, incluso dentro de una misma especie las comparaciones de los valores de AMH obtenidos con diferentes ensayos o protocolos pueden

ser problemáticas, ya que se han informado diferencias cercanas a un 70% en la concentración de AMH en muestras humanas analizadas con diferentes ensayos (Bonifacio et al., 2015; Moolhuijsen & Visser, 2020). Además, las variaciones en la cinética de unión de los anticuerpos utilizados en diferentes ensayos pueden dar lugar a diferencias en la recuperación y, por lo tanto, en los valores de AMH informados. No podemos determinar la razón precisa de las diferentes concentraciones de AMH obtenidas en este experimento comparadas con la de otros reportes, lo que debería ser motivo de estudio en futuros trabajos. Mientras tanto, es importante tener en cuenta que se debe ser cuidadoso con la utilización de valores de AMH como punto de corte para la selección de ovejas como futuras donantes de embriones.

Al evaluar la relación entre los niveles séricos de AMH y los resultados al tratamiento de superovulación, se reflejó una correlación positiva entre los valores de AMH y el número total de cuerpos lúteos (respuesta ovulatoria) al día de la colecta embrionaria; y tendencias positivas con estructuras totales colectadas y número de fertilizados. Un estudio previo (Lahoz et al., 2015) reportó resultados similares en ovejas adultas de la raza aragonesa, con una relación fuerte entre la tasa de ovulación y las concentraciones plasmáticas de AMH ($r=0.70$; $P<0.001$). Con respecto a las demás variables medidas no se encontraron valores significativos. AFC se correlacionó positivamente con las estructuras totales y número de fertilizados. Se obtuvo una tendencia positiva con el número de cuerpos lúteos, confirmando y respaldando la relación entre AFC y AMH ya que estos marcadores presentaron resultados similares a cerca de sus correlaciones con variables determinantes para evaluar el rendimiento de un tratamiento de superovulación (Figura 3).

Los datos presentados contribuyen para los avances hacia la búsqueda de marcadores de la reserva ovárica, y tanto las concentraciones de AMH como de AFC representan herramientas que podrán ser de utilidad (Fleming et al., 2015). Aunque se ha demostrado que el recuento de la población folicular o AFC es eficaz para predecir la respuesta ovárica y el rendimiento embrionario en ovejas (Bartlewski et al., 2016; Cognié et al., 2003; Gonzalez de Bulnes et al., 2002; Pinto et al., 2018), la utilidad de la AMH no está suficientemente clara en estos animales. En cuanto al objetivo de la presente tesis, fue demostrado que la determinación de las concentraciones séricas de AMH en una etapa no conocida del ciclo estral, antes de la estimulación ovárica, podría ser moderadamente útil para la predicción de la respuesta al tratamiento de superovulación y selección de las mejores donantes debido a la correlación positiva con variables representativas de la respuesta ovárica en un programa MOET.

El estudio de la relación entre los niveles de AMH y la producción de embriones, nos permitió en esta tesis realizar un segundo análisis para asociar estos resultados al régimen de superovulación con 6 u 8 dosis de FSH. En esta segunda etapa de análisis, se compararon dos niveles contrastantes de reserva ovárica determinada por AMH, utilizando ovejas con bajos vs. altos niveles de esta hormona. Desde el punto de vista práctico o aplicado, los niveles séricos de AMH podrían ser más adecuados para seleccionar futuras donantes que el número de folículos determinado por ultrasonografía, ya que la variación a lo largo del ciclo estral es menor en los niveles de AMH que en el número de folículos (Baruselli et al., 2015). En ovejas y vacas, el número de folículos determinado por ultrasonografía puede tener un

rango muy amplio de variación en un mismo animal según el día del ciclo estral (Bartlewski et al., 1999; Burns et al., 2005; Sakaguchi et al., 2019). Al comparar los grupos con niveles bajos y altos de AMH en un tratamiento de 6 u 8 dosis de FSH, la producción de embriones fue afectada de manera diferencial. En donantes del grupo de baja AMH, al aumentar la duración del tratamiento con FSH de 6 a 8 dosis se incrementó el número de embriones producidos (estructuras fertilizadas, número de transferibles y congelables). Por el contrario, en donantes con altos niveles de AMH, la extensión de la duración del tratamiento con FSH no afectó el rendimiento embrionario. Estos resultados podrían tener dos implicancias prácticas interesantes: a) por un lado sugieren la ventaja de extender el tratamiento con FSH a un régimen de 8 dosis para aquellas ovejas con niveles bajos de AMH, y b) a la vez también brindan la posibilidad de simplificar el número de inyecciones de FSH a 6 dosis en hembras de alta reserva ovárica.

Este hallazgo discutido en el párrafo anterior puede tener su explicación en algunos resultados reportados en estudios previos. Los animales con bajos niveles de AFC o AMH presentan mayores concentraciones circulantes de FSH (Ireland et al., 2007; Torres-Rovira et al., 2016) y las células foliculares tienen una respuesta reducida a las gonadotrofinas (Mossa et al., 2017; Scheetz et al., 2012). Por ejemplo, las células de la granulosa en vacas con bajos niveles de AFC tienen una menor expresión de receptores de FSH, llevándolos a ser refractarios a la estimulación con FSH, y también tienen una disminución en la secreción de estradiol en respuesta a la FSH (Scheetz et al., 2012). Esto podría explicar por qué al aumentar la dosis de FSH no se ha logrado mejorar la respuesta a la superovulación, como ha sido reportado recientemente en vaquillonas de raza lechera (Karl et al., 2021). En dicho trabajo se evaluaron cuatro dosis de FSH en animales de baja reserva ovárica y se encontró que las dosis altas de FSH no mejoraron el crecimiento folicular y la respuesta al tratamiento de superovulación. Incluso se ha sugerido que dosis de FSH excesivamente altas para donantes de baja reserva ovárica tendrían efectos perjudiciales sobre la capacidad ovulatoria de los folículos (Karl et al., 2021). Algunos de los posibles mecanismos que sustentan esta hipótesis es que altas dosis de FSH pueden influenciar la señalización en cascada de las gonadotrofinas en las células de la granulosa, teca y luteales (Scheetz et al., 2012) de los folículos y también promover una luteinización temprana, lo que conllevaría a una disparidad en la calidad de los ovocitos y también la pérdida de ovocitos (Clark et al., 2022). Por este motivo, en la presente tesis se prefirió avanzar en el estudio de la duración del tratamiento con FSH, manteniendo la misma dosis total administrada en el régimen de 6 dosis como en uno de 8 dosis. Los resultados sugieren que al menos en ovejas, puede haber un efecto favorable mediante el ajuste en la duración del tratamiento.

La modificación en la longitud del tratamiento con FSH ha sido reportada en varios trabajos en diferentes especies, con resultados controversiales. Sin embargo, esto casi no había sido estudiado considerando la reserva ovárica de las donantes. En un trabajo realizado en vacas de carne hace unos años (García Guerra et al., 2012), al alargar el tratamiento con FSH de 4 a 7 dosis se encontró un aumento en la respuesta ovárica debido a un mayor número de ovulaciones y cuerpos lúteos. Aunque el número de estructuras fertilizadas, embriones

transferibles y congelables fue numéricamente superior, no se encontraron diferencias significativas. En otro estudio con terneras prepubes con una población folicular similar, un tratamiento con FSH de 7 días resultó en una mayor respuesta ovárica al compararlo con uno de 4 días (Krause et al., 2020). Estos hallazgos podrían ser respaldados por la teoría de que la prolongación de la exposición a la FSH sería beneficiosa para la diferenciación de las células de la granulosa, lo que resultaría en una mejor respuesta a la estimulación de la hormona LH, permitiendo que los folículos alcancen una mejor madurez y calidad de los ovocitos (Dias et al., 2018). Esto podría explicar, al menos en parte, los resultados obtenidos en la presente tesis.

En un reporte previo en terneras prepubes, se evaluó el efecto de la variación individual de la reserva ovárica (folículos ≥ 1 mm de diámetro) antes de llevar a cabo un tratamiento de FSH de 7 o 4 días de duración. Como resultado, la proporción de folículos grandes (número de folículos ≥ 9 mm/ número de folículos ≥ 3 mm) presentó una tendencia a ser superior para el grupo de bajo número de conteo de folículos antrales cuando las terneras fueron tratadas durante 7 días de FSH (Krause et al., 2021). Estos resultados podrían ser complementarios a lo encontrado en esta tesis, sugiriendo que las donantes con baja reserva ovárica podrían verse beneficiadas al aumentar el tiempo de exposición a la FSH, reclutando un mayor número de folículos y alcanzando un mayor diámetro de dichos folículos. En base a los estudios revisados en esta tesis, sugerimos que una exposición más prolongada a la FSH puede ser beneficiosa en aquellas hembras con baja reserva ovárica. Esto podría deberse a un tiempo más prolongado para la diferenciación de las células de la granulosa, maduración nuclear y citoplasmática, para la adquisición de una mejor capacidad de respuesta a la LH en el futuro, y todo esto conducir a la inducción de ovulaciones de ovocitos de mejor calidad.

Finalmente, esta tesis es el primer estudio que demuestra la relación entre la duración del tratamiento con FSH y los niveles de AMH en búsqueda de mejorar la producción de embriones en ovejas. Se comprobó que, al reducir el tiempo de exposición a la FSH en animales de baja reserva ovárica, se observaron diferencias en la capacidad de respuesta ovulatoria y la producción de embriones. Estos animales mostraron un menor número de estructuras fecundadas, así como una disminución en la tasa de fecundación, la cantidad de embriones transferibles y congelables. Esto confirma que el tratamiento de 6 dosis no sería una alternativa recomendada para animales con escasa reserva ovárica. Por este motivo, a modo de asegurar una respuesta favorable, el régimen de 8 dosis sigue siendo recomendado en aquellas donantes en que no es realizado un análisis y clasificación previa de la reserva ovárica. Sin embargo, en caso de poder clasificar las donantes de acuerdo con su reserva ovárica, se podría ajustar los protocolos de acuerdo con este factor optimizando así los resultados obtenidos.

Los resultados encontrados en este trabajo amplían nuestro conocimiento sobre cómo la reserva ovárica influye en la respuesta ovárica a tratamientos de superestimulación en ovejas y cómo podemos usar esta información para mejorar la forma de administración de FSH.

8. CONCLUSIONES

Los niveles de AMH están relacionados positivamente con la reserva ovárica en ovejas, lo que tiene implicaciones prácticas para predecir la respuesta ovárica y la producción de embriones en programas MOET.

La determinación de la AMH previo a los tratamientos con FSH puede ser utilizada mejorar la producción de embriones, especialmente en ovejas con baja reserva ovárica.

Al observamos que la producción de embriones es favorecida en ovejas con bajos niveles de AMH al aumentar el tratamiento de 6 a 8 dosis de FSH, sugerimos dos estrategias prácticas:

1. Si no se conoce la reserva ovárica de las donantes, es recomendable usar el régimen de 8 dosis para todas las ovejas;
2. Si se realiza la determinación de AMH, las ovejas con baja reserva ovárica necesitan 8 dosis para obtener un buen rendimiento, mientras que las de alta reserva ovárica pueden usar un régimen de 6 dosis.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Baarends, W. M., Uilenbroek, J. T. J., Kramer, P., Hoogerbrugge, J. W., van Leeuwen, E. C. M., Themmen, A. P. N., & Grootegoed, J. A. (1995). Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type ii receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology*, *136*(11). <https://doi.org/10.1210/endo.136.11.7588229>
- Baril, G., Pougnaud, J. L., Freitas, V. J. F., Leboeuf, B., & Saumande, J. (1996). A new method for controlling the precise time of occurrence of the preovulatory gonadotropin surge in superovulated goats. *Theriogenology*, *45*(3). [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00416-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00416-6)
- Bartlewski, P. M., Beard, A. P., Cook, S. J., Chandolia, R. K., Honaramooz, A., & Rawlings, N. C. (1999). Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *Journal of Reproduction and Fertility*, *115*(1). <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1150111>
- Bartlewski, P. M., Seaton, P., Franco Oliveira, M. E., Kridli, R. T., Murawski, M., & Schwarz, T. (2016). Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. En *Theriogenology* (Vol. 86, Número 1). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.024>
- 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).
- Bo, G. A., Hockley, D. K., Nasser, L. F., & Mapletoft, R. J. (1994). Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Follitropin-V in beef cattle. *Theriogenology*, *42*(6). [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90119-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90119-4)
- Bonifacio, M., Bradley, C. K., Karia, S., Livingstone, M., Bowman, M. C., & McArthur, S. J. (2015). The original Beckman Coulter Generation II assay significantly underestimates AMH levels compared with the revised protocol. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *32*(11). <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0579-y>
- Bruno-Galarraga, M. M., Cueto, M., Gibbons, A. E., Pereyra-Bonnet, F., Catalano, R., & Gonzalez-

Bulnes, A. (2014). Repeatability of superovulatory response to successive FSH treatments in Merino sheep. *Small Ruminant Research*, 120(1).
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.04.002>

- Burns, D. S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J. L. H., Knight, P. G., & Ireland, J. J. (2005). Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biology of Reproduction*, 73(1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036277>
- Cate, R. L. (2022). Anti-Müllerian Hormone Signal Transduction involved in Müllerian Duct Regression. *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.905324>
- Clark, Z. L., Karl, K. R., Ruebel, M. L., Latham, K. E., & Ireland, J. J. (2022). Excessive follicle-stimulating hormone during ovarian stimulation of cattle may induce premature luteinization of most ovulatory-size follicles. *Biology of Reproduction*, 106(5). <https://doi.org/10.1093/biolre/iaoc021>
- Cognie, Y. (1999). State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, 51(1). [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00235-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00235-0)
- Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N., & Mermillod, P. (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 59(1). [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01270-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01270-0)
- Cook, C. L., Siow, Y., Taylor, S., & Fallat, M. E. (2000). Serum mullerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertility and Sterility*, 73(4). [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00639-1](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00639-1)
- Cuadro, F., dos Santos-Neto, P. C., Pinczak, A., Barrera, N., Crispo, M., & Menchaca, A. (2018). Serum progesterone concentrations during FSH superstimulation of the first follicular wave affect embryo production in sheep. *Animal Reproduction Science*, 196. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.011>
- Dattena, M., Vespignani, S., Branca, A., Gallus, M., Ledda, S., Naitana, S., & Cappai, P. (1994). Superovulatory response and quality of embryos recovered from anestrus ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 42(2). [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90267-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90267-4)
- Dias, F. C. F., Khan, M. I. R., Sirard, M. A., Adams, G. P., & Singh, J. (2018). Transcriptome analysis of granulosa cells after conventional vs long FSH-induced superstimulation in cattle. *BMC Genomics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4642-9>
- Durlinger, A. L. L., Kramer, P., Karels, B., De Jong, F. H., Uilenbroek, J. T. J., Anton Grootegoed, J., & Themmen, A. P. N. (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, 140(12). <https://doi.org/10.1210/endo.140.12.7204>
- Elsden, R. P., Nelson, L. D., & Seidel, G. E. (1978). Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*, 9(1). [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(78\)90049-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(78)90049-3)
- Evans, A. C. O. (2003). Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Animal Reproduction Science*, 78(3-4). [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00096-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00096-4)
- Evans, A. C. O., Duffy, P., Hynes, N., & Boland, M. P. (2000). Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology*, 53(3). [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00268-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00268-X)

- Fleming, R., Seifer, D. B., Frattarelli, J. L., & Ruman, J. (2015). Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. En *Reproductive BioMedicine Online* (Vol. 31, Número 4). <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.06.015>
- Forcada, F., Amer-Meziane, M. A., Abecia, J. A., Maurel, M. C., Cebrián-Pérez, J. A., Muñio-Blanco, T., Asenjo, B., Vázquez, M. I., & Casao, A. (2011). Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for in vivo embryo production in sheep. *Theriogenology*, 75(4). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.019>
- Fortune, J. E. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction*, 50(2). <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.2.225>
- García Guerra, A., Tribulo, A., Yapura, J., Singh, J., & Mapletoft, R. J. (2012). Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology*, 78(2). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.010>
- Gibbons, J. R., Kot, K., Thomas, D. L., Wiltbank, M. C., & Ginther, O. J. (1999). Follicular and FSH dynamics in ewes with a history of high and low ovulation rates. *Theriogenology*, 52(6). [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00191-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00191-0)
- Gigli, I., Cushman, R. A., Wahl, C. M., & Fortune, J. E. (2005). Evidence for a role for anti-Müllerian hormone in the suppression of follicle activation in mouse ovaries and bovine ovarian cortex grafted beneath the chick chorioallantoic membrane. *Molecular Reproduction and Development*, 71(4). <https://doi.org/10.1002/mrd.20338>
- Ginther, O. J., Kot, K., & Wiltbank, M. C. (1995). Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology*, 43(3). [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)00074-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)00074-5)
- Gonzalez De Bulnes, A., Santiago Moreno, J., Gomez-Brunet, A., Inskip, E. K., Townsend, E. C., & Lopez-Sebastian, A. (1999). Follicular dynamics during the oestrous cycle in dairy goats. *Animal Science*, 68(3). <https://doi.org/10.1017/S1357729800050578>
- González-Bulnes, A., Baird, D. T., Campbell, B. K., Cocero, M. J., García-García, R. M., Inskip, E. K., López-Sebastián, A., McNeilly, A. S., Santiago-Moreno, J., Souza, C. J. H., & Veiga-López, A. (2004). Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. En *Reproduction, Fertility and Development* (Vol. 16, Número 4). <https://doi.org/10.1071/RD04033>
- Gonzalez-Bulnes, A., Garcia-Garcia, R. M., Santiago-Moreno, J., Lopez-Sebastian, A., & Cocero, M. J. (2002). Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology*, 58(8). [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01078-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01078-6)
- Gonzalez-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., Cocero, M. J., & Lopez-Sebastian, A. (2000). Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*, 54(7). [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00414-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00414-3)
- Guilbault, L. A., Grasso, F., Lussier, J. G., Rouillier, P., & Matton, P. (1991). Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 91(1). <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0910081>
- Ireland, J. J., Smith, G. W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Ireland, J. L. H., Mossa, F., Lonergan, P., & Evans, A. C. O. (2011). Does size matter in females? An overview of the

- impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(1). <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). <https://doi.org/10.1093/humrep/dem071>
- Ireland, J. L. H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A. P. N., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G. W., Perez, G. I., Evans, A. C. O., & Ireland, J. J. (2008). Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biology of Reproduction*, 79(6). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071670>
- Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Ireland, J. L. H., Smith, G. W., Hou, X., Davis, J. S., Lonergan, P., Evans, A. C. O., & Ireland, J. J. (2009). Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *Biology of Reproduction*, 80(6). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075093>
- Karl, K. R., Jimenez-Krassel, F., Gibbings, E., Ireland, J. L. H., Clark, Z. L., Tempelman, R. J., Latham, K. E., & Ireland, J. J. (2021). Negative impact of high doses of follicle-stimulating hormone during superovulation on the ovulatory follicle function in small ovarian reserve dairy heifers. *Biology of Reproduction*, 104(3). <https://doi.org/10.1093/biolre/iaaa210>
- Kevenaar, M. E., Meerasahib, M. F., Kramer, P., van de Lang-Born, B. M. N., de Jong, F. H., Groome, N. P., Themmen, A. P. N., & Visser, J. A. (2006). Serum anti-Müllerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology*, 147(7). <https://doi.org/10.1210/en.2005-1588>
- Krause, A. R. T., Dias, F. C. F., Adams, G. P., Mapletoft, R. J., & Singh, J. (2020). Effect of dose and duration of FSH treatment on ovarian response in prepubertal calves. *Animal Reproduction Science*, 219. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106471>
- Krause, A. R. T., Dias, F. C. F., Adams, G. P., Mapletoft, R. J., & Singh, J. (2021). Antral follicle counts and association with ovarian superstimulatory response to gonadotropins in prepubertal calves. *Animal Reproduction Science*, 227. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106730>
- la Marca, A., & Volpe, A. (2006). Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: Is measurement of circulating AMH a useful tool? En *Clinical Endocrinology* (Vol. 64, Número 6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02533.x>
- Lahoz B, Alabart J, P S, E E, J F. Election of the best embryo donor ewes by determining their plasma AMH (anti-müllerian hormone). (2015) XVI Jornadas sobre Producción Animal AIDA. Zaragoza, España. p. 447-9.
- Lahoz, B., Alabart, J. L., Cocero, M. J., Monniaux, D., Echegoyen, E., Sánchez, P., & Folch, J. (2014). Anti-Müllerian hormone concentration in sheep and its dependence of age and independence of BMP15 genotype: An endocrine predictor to select the best donors for embryo biotechnologies. *Theriogenology*, 81(2). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.033>

- Lahoz, B., Alabart, J. L., Monniaux, D., Mermillod, P., & Folch, J. (2012). Anti-Müllerian hormone plasma concentration in prepubertal ewe lambs as a predictor of their fertility at a young age. *BMC Veterinary Research*, 8. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-118>
- Laster, D. B. (1972). Disappearance and uptake of (125 I) FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *Journal of reproduction and fertility*, 30(3). <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0300407>
- Mapletoft, R. J., & Bó, G. a. (2013). Innovative strategies for superovulation in cattle. *Animal Reproduction*, 10(3).
- Menchaca, A., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P. C., Bosolasco, D., Barrera, N., de Brun, V., & Crispo, M. (2018). Oocyte developmental competence is improved by relatively greater circulating progesterone concentrations during preovulatory follicular growth. *Animal Reproduction Science*, 195. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.010>
- Menchaca, A., Vilariño, M., Crispo, M., Pinczak, A., & Rubianes, E. (2007). Day 0 Protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology*, 68(8). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.07.020>
- Menchaca, A., Vilariño, M., Pinczak, A., Kmaid, S., & Saldaña, J. M. (2009). Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology*, 72(4). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.04.002>
- Menchaca, A., Vilario, M., Crispo, M., de Castro, T., & Rubianes, E. (2010). New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. En *Reproduction, Fertility and Development* (Vol. 22, Número 1). <https://doi.org/10.1071/RD09222>
- Monniaux, D., Baril, G., Laine, A. L., Jarrier, P., Poulin, N., Cogneánd, J., & Fabre, S. (2011). Anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. *Reproduction*, 142(6). <https://doi.org/10.1530/REP-11-0211>
- Monniaux, D., Chupin, D., & Saumande, J. (1983). Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, 19(1). [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(83\)90124-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(83)90124-3)
- Monniaux, D., Drouilhet, L., Rico, C., Estienne, A., Jarrier, P., Touzé, J. L., Sapa, J., Florence Phocas, Dupont, J., Dalbiés-Tran, R., & Fabre, S. (2013). Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(1). <https://doi.org/10.1071/RD12270>
- Moolhuijsen, L. M. E., & Visser, J. A. (2020). Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function. En *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (Vol. 105, Número 11). <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa513>
- Mossa, F., Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D., Weber-Nielsen, M., Evans, A. C. O., & Ireland, J. J. (2017). Anti-Müllerian Hormone (AMH) and fertility management in agricultural species. En *Reproduction* (Vol. 154, Número 1). <https://doi.org/10.1530/REP-17-0104>
- Nasser, L. F., Adams, G. P., Bo, G. A., & Mapletoft, R. J. (1993). Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, 40(4). [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90207-L](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90207-L)
- Nasser, L. F., Sá Filho, M. F., Reis, E. L., Rezende, C. R., Mapletoft, R. J., Bó, G. A., & Baruselli, P. S. (2011). Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, 76(2). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.009>

- Pankhurst, M. W., Chong, Y. H., & McLennan, I. S. (2014). Enzyme-linked immunosorbent assay measurements of antimüllerian hormone (AMH) in human blood are a composite of the uncleaved and bioactive cleaved forms of AMH. *Fertility and Sterility*, *101*(3). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.12.009>
- Pinto, P. H. N., Balaro, M. F. A., Souza-Fabjan, J. M. G., Ribeiro, L. dos S., Bragança, G. M., Leite, C. R., Arashiro, E. K. N., de Moraes Silva, K., da Fonseca, J. F., & Brandão, F. Z. (2018). Anti-Müllerian hormone and antral follicle count are more effective for selecting ewes with good potential for in vivo embryo production than the presence of FecGE mutation or eCG pre-selection tests. *Theriogenology*, *113*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.02.018>
- Rajakoski, E. (1960). The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Obstetrical and Gynecological Survey*, *15*(6). <https://doi.org/10.1097/00006254-196012000-00024>
- Rico, C., Fabre, S., Médigue, C., Clemente, N. di, Clément, F., Bontoux, M., Touzé, J. L., Dupont, M., Briant, E., BenoîtRémy, Beckers, J. F., & Monniaux, D. (2009). Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biology of Reproduction*, *80*(1). <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). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088187>
- Rivera, F. A., Mendonça, L. G. D., Lopes, G., Santos, J. E. P., Perez, R. V., Amstalden, M., Correa-Calderón, A., & Chebel, R. C. (2011). Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. *Reproduction*, *141*(3). <https://doi.org/10.1530/REP-10-0375>
- Rubianes, E., Ibarra, D., Ungerfeld, R., Carbajal, B., & de Castro, T. (1995). Superovulatory response in anestrous ewes is affected by the presence of a large follicle. *Theriogenology*, *43*(2). [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)00039-W](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)00039-W)
- Rubianes, E., & Menchaca, A. (2003). The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Animal Reproduction Science*, *78*(3-4). [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00095-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00095-2)
- 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). <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0534-3>
- Savio, J. D., Keenan, L., Boland, M. P., & Roche, J. F. (1988). Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, *83*(2). <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0830663>
- Scaramuzzi, R. J., Baird, D. T., Campbell, B. K., Driancourt, M. A., Dupont, J., Fortune, J. E., Gilchrist, R. B., Martin, G. B., McNatty, K. P., McNeilly, A. S., Monget, P., Monniaux, D., Viñoles, C., & Webb, R. (2011). Regulation of folliculogenesis and the determination of

- ovulation rate in ruminants. En *Reproduction, Fertility and Development* (Vol. 23, Número 3). <https://doi.org/10.1071/RD09161>
- Scheetz, D., Folger, J. K., Smith, G. W., & Ireland, J. J. (2012). Granulosa cells are refractory to FSH action in individuals with a low antral follicle count. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(2). <https://doi.org/10.1071/RD11020>
- Simonetti, L., Forcada, F., Rivera, O. E., Carou, N., Alberio, R. H., Abecia, J. A., & Palacin, I. (2008). Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. *Animal Reproduction Science*, 104(2-4). <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.01.020>
- Souza, A. H., Carvalho, P. D., Rozner, A. E., Vieira, L. M., Hackbart, K. S., Bender, R. W., Dresch, A. R., Verstegen, J. P., Shaver, R. D., & 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). <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8182>
- Souza, C. J. H., Campbell, B. K., & Baird, D. T. (1997). Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 56(2). <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.2.483>
- Teixeira, J., Maheswaran, S., & Donahoe, P. K. (2001). Müllerian inhibiting substance: An instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. En *Endocrine Reviews* (Vol. 22, Número 5). <https://doi.org/10.1210/er.22.5.657>
- Torres-Rovira, L., Gonzalez-Bulnes, A., Succu, S., Spezzigu, A., Manca, M. E., Leoni, G. G., Sanna, M., Pirino, S., Gallus, M., Naitana, S., & Berlinguer, F. (2014). Predictive value of antral follicle count and anti-Müllerian hormone for follicle and oocyte developmental competence during the early prepubertal period in a sheep model. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(8). <https://doi.org/10.1071/RD13190>
- Torres-Rovira, L., Succu, S., Pasciu, V., Manca, M. E., Gonzalez-Bulnes, A., Leoni, G. G., Pennino, M. G., Spezzigu, A., Gallus, M., Dattena, M., Monniaux, D., Naitana, S., & Berlinguer, F. (2016). Postnatal pituitary and follicular activation: A revisited hypothesis in a sheep model. *Reproduction*, 151(3). <https://doi.org/10.1530/REP-15-0316>
- Tríbulo, A., Rogan, D., Tríbulo, H., Tríbulo, R., Mapletoft, R. J., & Bó, G. A. (2012). Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology*, 77(8). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.013>
- Vilariño, M., Rubianes, E., & Menchaca, A. (2013). Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, 79(1). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.007>
- Visser, J. A., de Jong, F. H., Laven, J. S. E., & Themmen, A. P. N. (2006). Anti-Müllerian hormone: A new marker for ovarian function. En *Reproduction* (Vol. 131, Número 1). <https://doi.org/10.1530/rep.1.00529>
- Yamamoto, M., Ooe, M., Kawaguchi, M., & Suzuki, T. (1994). Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 41(3). [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90184-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90184-4)

