



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“Hormona Antimülleriana como predictor del recuento de folículos antrales en vacas Holstein mestizas bajo sistema de pastoreo sobre los 2.500msnm”

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

Autor:

Ernesto Cobos Espinoza

CI: 0106060304

eneto107@hotmail.com

Director:

Luis Eduardo Ayala Guanga

CI: 0102635463

Cuenca, Ecuador

10-septiembre-2021

**RESUMEN:**

La investigación se realizó en las provincias del Azuay y Cañar en 135 vacas Holstein mestizas. Los objetivos fueron: 1) Caracterizar los niveles de hormona Antimülleriana (AMH), para clasificar vacas con alto y bajo nivel de esta glicoproteína, 2) Determinar si los grupos de alto y bajo nivel de AMH mantienen relación con el número de folículos antrales (RFA). Se sincronizó la onda folicular con una inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) convencional: Día 0, dispositivo intravaginal (CIDR) + 2mg de benzoato de estradiol (IM); Día 7, retiro del CIDR+25 mg de prostaglandina (IM) + parches detectores de celo; Día 8, 1mg de benzoato de estradiol; Día 9 (54 h pos-retiro del implante), se realizó ecografía para determinar ubicación del folículo preovulatorio; y Día 11(102 h pos-retiro del implante), se tomó 4ml de sangre de la vena coccígea en tubos con EDTA, luego se centrifugó a 3.000rpm/20min, se recuperó y congeló el plasma a -20°C , hasta el análisis de la AMH mediante el kit de ELISA, (kit DL-AMH-b, Develop[®], China). El RFA fue realizado el día 11, mediante un ecógrafo portátil (Aloka ProSound 2[®], Tokyo-Japón), con sonda lineal de 7,5 MHz. Se estableció una concentración plasmática de AMH de $0,06 \pm 0,03$ ng/ml, con un rango entre 0,03 y 0,16 ng/ml y un RFA $\geq 3\text{mm}$ de $17,26 \pm 0,38$ folículos, con valores entre 30 y 7 folículos, Además se determinó una correlación y asociación entre la AMH y el RFA alto y significativo ($r= 0,783$; $p<0,0001$ y $R^2=0,613$ respectivamente). Al realizar grupos de alta, media y baja concentración de AMH, se observó en promedio tres veces más AMH ($0,14 \pm 0,02$ ng/ml) en el grupo de alta, en relación al grupo de baja ($0,04 \pm 0,001$ ng/ml; $p< 0,05$). Se concluye que la concentración de AMH, guardan relación y asociación directa con el RFA.

Palabras claves: Hormona Antimülleriana. Folículos. Bovinos. Elisa

**ABSTRACT:**

The present research was performed on 135 crossbred Holstein cows. The objectives were: 1) to characterize the levels of Antimülleriana hormone (AMH), to classify cows with high and low levels of this glycoprotein, and 2) to determine if the groups with high and low levels of AMH are related to the number of antral follicles (NFA). The follicular wave was synchronized with a conventional fixed-time artificial insemination (FTAI) protocol: day 0 = intravaginal device CIDR + 2mg of estradiol benzoate (IM). Day 7 = removal of CIDR plus 25 mg of prostaglandin and then application of heat detection patches; Day 8 = 1mg estradiol benzoate; Day 9 (54h post-implant removal) = transrectal ultrasonography evaluation to determine the location of the preovulatory follicle; and Day 11= 4ml of blood was taken from the coccygeal vein in tubes with EDTA, then it was centrifuged at 3,000rpm / 20min, the plasma was recovered and frozen at -20 ° C, until AMH analysis using the sandwich ELISA kit (DL-AMH-b kit, Develop®, China). The RFA was performed at day 11, using a portable ultrasound machine (Aloka ProSound 2®, Tokyo-Japan), with a linear probe and 7,5 MHz. A plasma AMH concentration of $0,06 \pm 0,03$ ng / ml was established, with a range between 0,03 and 0,16 ng / ml and an RFA ≥ 3 mm of $17,26 \pm 0,38$ follicles, with values between 30 and 7 follicles. A correlation and association between AMH and RFA high and significant ($r = 0,783$; $p < 0,0001$ and $R^2 = 0,613$ respectively). When performing groups of high, medium and low AMH concentration, there are on average three times more AMH ($0,14 \pm 0,02$ ng / ml) in the high group, in relation to the low group ($0,04 \pm 0,001$ ng / ml; $p < 0,05$). In effect, the concentration of AMH is directly related and associated with RFA.

Keywords: Antimullerian Hormone. Follicles. Bovines. Elisa



ÍNDICE

<u>RESUMEN:</u>	2
<u>ABSTRACT:</u>	3
<u>Índice de tablas</u>	5
<u>Índice de figuras</u>	5
<u>Índice de anexos</u>	6
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	9
<u>DEDICATORIA</u>	10
<u>1. INTRODUCCIÓN.</u>	11
<u>2. OBJETIVOS.</u>	16
2.1. <u>Objetivo general.</u>	16
2.2. <u>Objetivos específicos.</u>	16
2.3. <u>Hipótesis.</u>	16
<u>3. REVISIÓN DE LITERATURA.</u>	17
<u>Protocolos de superovulación en el ganado bovino</u>	17
<u>Problema en la respuesta individual (vaca) a los programas de superovulación</u>	18
<u>Números foliculares y respuesta superovularia</u>	18
<u>Hormona Antimülleriana (AMH)</u>	20
<u>Papel de la AMH en la mujer</u>	21
<u>AMH en el ganado bovino</u>	24
<u>Utilidad de AMH</u>	25
<u>AMH y respuesta superovulatoria</u>	25
<u>4. MATERIALES Y MÉTODOS.</u>	30
<u>Materiales.</u>	30
<u>Métodos.</u>	32
1.2.1. <u>Área de estudio.</u>	32
1.2.2. <u>Metodología de la investigación.</u>	33
<u>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</u>	38



5.1	<u>Promedio general de la concentración de hormona Antimülleriana (AMH)</u>	38
5.2	<u>Promedio general del recuento de folículos antrales (RFA)</u>	40
5.3	<u>Resultados de la correlación y regresión lineal de la AMH y RFA</u>	41
5.4	<u>Resultados de la correlación y regresión lineal de la AMH y RFA por grupos de baja, media y alta concentración de AMH</u>	42
5.5	<u>Nivel de hormona Antimülleriana y el recuento de folículos antrales en los grupos de alta, media y baja concentración de AMH</u>	45
6.	<u>CONCLUSIONES</u>	48
7.	<u>RECOMENDACIONES</u>	49
8.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	50
9.	<u>ANEXOS</u>	61
	<u>Anexo 2</u>	63

Índice de tablas

<u>Tabla 1.</u>	<u>Resumen de los niveles plasmáticos de la hormona Antimülleriana (AMH) y recuento de folículos antrales (RFA), determinados en el momento del reinicio de la onda folicular, en vacas Holstein mestizas</u>	41
------------------------	--	-----------

Índice de figuras

<u>Figura 1.</u>	<u>Mapa de la ubicación del área de estudio</u>	32
-------------------------	--	-----------

Figura 2. **Esquema del protocolo de sincronización de la onda de crecimiento folicular, evaluación ultrasonográfica y toma de muestra de sangre, para la determinación de la concentración de Hormona Antimülleriana y recuento de folículos >3mm. RFA=recuento de folículos antrales. US=ultrasonografía. MS=toma de muestras de sangre. BE=benzoato**



de estradiol. PG=prostaglandina. FPO=folículo preovulatorio. CIDR=dispositivo de progesterona..... 34

Figura 3. Gráfico de dispersión que representa la asociación entre los niveles plasmáticos de la hormona Antimülleriana (AMH) con el recuento de folículos antrales (RFA). Se muestra una línea de regresión lineal simple con su ecuación para facilitar la interpretación de los datos. 41

Figura 4. Niveles plasmáticos de la hormona Antimülleriana (Figura 3A) y recuento de folículos antrales (Figura 3B) en el día 11 del protocolo de sincronización en vacas Holstein mestizas clasificadas con diferentes poblaciones foliculares: baja (14,08±2,68); media (16,89±3,22) y alta (25,0±2,21). Los literales a, b y c indican diferencia estadística significativa entre los tres grupos experimentales: $a \neq b \neq c$, $p < 0,05$ 45

Índice de anexos

Anexo 1: Trabajo en campo 61

Anexo 2. Materiales y Equipos empleados en Laboratorio..... 63

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Ernesto Cobos Espinoza, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **“Hormona Antimülleriana como predictor del recuento de folículos antrales en vacas Holstein mestizas bajo sistema de pastoreo sobre los 2.500msnm”** de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad de Cuenca, una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Cuenca, 10 de Septiembre de 2021



Ernesto Cobos Espinoza

C.I: 0106060304

Cláusula de Propiedad Intelectual

Ernesto Cobos Espinoza, autor del trabajo de titulación **“Hormona Antimülleriana como predictor del recuento de folículos antrales en vacas Holstein mestizas bajo sistema de pastoreo sobre los 2.500msnm”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 10 de Septiembre de 2021



Ernesto Cobos Espinoza

C.I: 0106060304



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por ser mi guía y acompañarme en el transcurso de mi vida, brindándome paciencia y sabiduría para culminar con éxito mis metas propuestas.

A mis padres por ser mi pilar fundamental y darme su apoyo incondicional. Por estar en mis momentos buenos y difíciles, que, con su ejemplo y dedicación, nunca bajaron sus brazos para que yo tampoco lo haga.

A mis hermanas Adriana, Virginia y Belén por el simple hecho de existir, gracias por su apoyo y siempre estar ahí para mí. Son las mejores, las quiero.

A mi tutor de tesis, Dr. Luis Ayala. Por haberme guiado, no solo en la elaboración de este trabajo de titulación, sino en mi carrera universitaria y en mi desarrollo profesional y personal.

A mis amigos (A.E.M), amigos de vida. Gracias a su apoyo incondicional, por ser como son y apoyar mis locuras, mis cambios de humor y motivarme a con éxito mi carrera.

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de la vida. Algunas están aquí conmigo y otras en el recuerdo y mi corazón. Gracias por formar parte de mí.



DEDICATORIA

...Por tu desinteresada ayuda, por echarme una mano cuando siempre la necesité, por aportar considerablemente en mi proyecto. Gracias Majo.



INTRODUCCIÓN.

Las biotecnologías reproductivas como la superovulación (SOV), aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU) y la producción de embriones *in vitro* (PIV), han demostrado un progreso significativo en los últimos años, y por lo tanto, son consideradas alternativas que ayudan al rápido mejoramiento genético del ganado bovino de la región (Bó & Mapletoft, 2014). Sin embargo, dichas técnicas están influenciadas por el recuento de folículos antrales (Ireland *et al.*, 2007), que por su alta variabilidad entre donantes compromete la eficacia de estas biotécnicas (Ireland *et al.*, 2011).

En la actualidad la ecografía transrectal es utilizada para identificar y seleccionar donantes con un RFA alto (Singh *et al.*, 2004). Sin embargo, es una técnica que requiere personal capacitado, equipos costosos e instalaciones adecuadas que faciliten la valoración cuidadosa de las imágenes obtenidas (Perry & Cushman, 2016); además, es necesario realizar varias exploraciones ecográficas durante cada ciclo estral para determinar con exactitud el RFA (Ginther, 2016).

Una alternativa a la técnica de ultrasonografía que ha generado gran expectativa es la cuantificación de la hormona Antimülleriana, una glicoproteína de 140 kDa que pertenece a la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF β), producida específicamente por las células de la granulosa de folículos pequeños en crecimiento (Monniaux *et al.*, 2010) y que mantiene relación directa con el RFA en vacas *Bos indicus* (Silva *et al.*, 2014), así como en *Bos taurus* (Souza *et al.*, 2015), criadas en el trópico bajo y mantenidas en condiciones de producción intensiva (Sakaguchi *et al.*, 2019).



Además, en la bibliografía encontramos evidencia de la relación entre RFA y la respuesta a los tratamientos de SOV en ganado bovino, presentando una correlación positiva y significativa ($r=0,64$; $P<0,05$; Hirayama *et al.*, 2017). Por otro lado, Abdel *et al.*, (2017) establecieron que donantes con una media de $4,24 \pm 0,12$ ng/ml de AMH producen un 30,41% más de embriones que vacas que poseen $2,66 \pm 0,19$ ng/ml de AMH.

De manera semejante, la concentración de AMH se correlacionó directamente con el número de folículos disponibles ($r=0,65$; $p<0,05$) y con el número de ovocitos recuperados mediante OPU ($r=0,78$; $P<0,05$; Ghanem *et al.*, 2016). Igualmente, Vernunft *et al.*, (2015) obtuvieron 30,48% más de ovocitos en donantes con altos niveles de AMH ($0,634 \pm 0,073$ ng/ml) frente las de bajos niveles de AMH ($0,185 \pm 0,011$ ng/ml). Además, investigadores como Guerreiro *et al.*, (2014), establecieron una correlación positiva entre la AMH y el número de embriones producidos *in vitro* ($r=0,36$; $P<0,001$).

Por lo antes descrito, se encuentra fuertemente sustentado que los niveles plasmáticos de AMH pueden ser utilizados como un biomarcador endocrino confiable para predecir el RFA en bovinos bajo sistemas intensivos, en trópico bajo y alimentados con raciones controladas. Sin embargo, por un lado, en cada uno de los estudios, los valores de cortes de la AMH propuestos para identificar donadoras difieren en función de la raza, piso altitudinal donde se crían y sistema de manejo. Además, hasta ahora la información disponible en ganado vacuno de genotipo Holstein mestizo, criado bajo condiciones climáticas de trópico alto (sobre los 2.500 msnm), mantenidas bajo un sistema de producción extensivo, al pastoreo a nuestro saber no existe.



Así, se encuentra documentado que los valores de corte difieren entre *Bos indicus* (Brahman; 0,70 ng/ml) y *Bos taurus* (Angus; 0,25 ng/ml) (Jaques *et al.*, 2020). Además, al valorar razas de misma subespecie (*taurus*), los valores de corte de la AMH muestran variabilidad, por ejemplo: Simmental (grupo alta= \geq 1ng/ml; grupo de baja= \leq 0,5ng/ml; Segvi *et al.*, 2019), Holstein: (grupo alta=0,631ng/ml; grupo de baja=0,085ng/ml; Ribeiro *et al.*, 2014).

Pero más impresionante es la variabilidad de los puntos de corte de AMH establecidos para una misma raza (Holstein), criados bajo sistemas de manejo similares (intensivos), con la única diferencia de que los animales se encontraban en pisos altitudinales diferentes (trópico bajo; grupo de alta= $0,4 \pm 0,02$ ng/ml; grupo de baja= $0,2 \pm 0,01$ ng/ml; Guerreiro *et al.*, 2014), y (trópico medio; grupo de alta=0,243ng/ml; grupo de baja=0,044ng/ml; Souza *et al.*, 2015).

Esta variabilidad en los puntos de corte descritos en los trabajos antes mencionados, nos permite plantear la hipótesis de que los niveles promedios de la AMH y su relación con el RFA en ganado vacuno Holstein mestizo, criado bajo condiciones climáticas de trópico alto (sobre los 2.500 msnm), mantenidas bajo un sistema de producción extensivo y alimentadas en pastoreo podrían ser diferentes a los determinados para esta raza en otras condiciones de manejo y alimentación hasta ahora existentes.

Planteamos este supuesto debido a que el trópico alto de la sierra del Ecuador es una zona templada ubicada sobre los 2.500 msnm, con varias formaciones agroecológicas, topografía accidentada, suelos erosionados con baja fertilidad (Malizia *et al.*, 2020). Donde existe alto grado de mestizaje (cruces) entre el ganado Criollo de la zona y la raza Hosltein



(introducida), estos bovinos a través de los años han logrado cualidades notables, como un alto instinto materno; excepcional resistencia a enfermedades; elevada capacidad para aprovechar la escasa, dispersa y variada vegetación natural, como los rastrojos de los cultivos y una menor exigencia en la tecnificación de las condiciones de manejo existentes en las explotaciones de la zona (Aguirre *et al.*, 2011).

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

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

En la especie bovina se observó que las terneras nacidas de madres con restricción nutricional (60% del requerimiento nutricional materno, durante los primeros 110 días de



gestación) mostraron recuento de folículos antrales (RFA) más bajos ($15,8 \pm 1,8$ folículos), con niveles de AMH más bajos y mayores valores de FSH, vs la descendencia de madres que consumieron el 120% del requerimiento nutricional (RFA= $23,6 \pm 1,9$) (Mossa *et al.*, 2013), lo cual podría alterar los niveles de AMH de estos animales en estas condiciones.



OBJETIVOS.

Objetivo general.

Establecer parámetros para el uso de la hormona Antimülleriana (AMH), en la selección de vacas donadoras con alta población de folículos antrales, para los programas de MOET. En animales de raza Holstein mestizas, al pastoreo, en ganaderías sobre los 2.500msnm.

Objetivos específicos.

- Caracterizar los niveles de hormona Antimülleriana (AMH), para clasificar vacas con alto y bajo nivel de esta glicoproteína.
- Determinar si los grupos de alto y bajo nivel de hormona Antimülleriana mantienen relación con el número de folículos antrales (RFA) presentes en los ovarios.

Hipótesis.

Los niveles de hormona Antimülleriana mantienen relación directa con el recuento de folículos antrales presentes en los ovarios de vacas Holstein mestizas, alimentadas al pastoreo, sobre los 2.500msnm.



REVISIÓN DE LITERATURA.

Protocolos de superovulación en el ganado bovino

La vida media fisiológica de la FSH en la vaca se ha estimado en 5 horas, por lo que debe administrarse dos veces al día para inducir con éxito la superovulación. El régimen habitual ha sido dos veces al día los tratamientos intramusculares con FSH durante 4 o 5 días, con una dosis total de 28 a 50 mg de un extracto pituitario crudo o 400 mg NIH-FSH-P1 de un extracto pituitario parcialmente purificado (Folltropin-V; Bioniche Animal Health Inc., Belleville, Ontario, Canadá). Cuarenta y ocho o 72 horas después del inicio del tratamiento, se administra PGF2 α para inducir luteólisis. El estro ocurre en 36 a 48 horas, con ovulaciones que comienzan 24 a 36 horas más tarde (Bó & Mapletoft, 2014). Muchos profesionales prefieren disminuir la dosis de FSH y otros usan programas de dosis constantes. Algunos tratan con PGF2 α en el tercer día del protocolo de tratamiento, y otros prefieren tratar con PGF2 α en el cuarto día, y muchos no tratan con FSH el día después de la administración de PGF2 α . Experimentos recientes han indicado que la tasa de ovulación puede mejorarse en algunas donantes si los tratamientos con FSH se administran durante 6 o 7 días (Lucio et al, 2016). Otros profesionales incorporan un dispositivo de progestina en el protocolo que asegura que los donantes no entren en celo temprano, especialmente si no es posible confirmar la presencia de CL antes de iniciar los tratamientos con FSH. En todos los casos, las inseminaciones normalmente se realizan 12 y 24 horas después del inicio del estro (Mapletoft, 2002).



Problema en la respuesta individual (vaca) a los programas de superovulación

El objetivo de los tratamientos para inducir la superovulación en programas de transferencia de embriones es obtener el máximo número de embriones transferibles con una alta probabilidad de producir preñez. Sin embargo, se han reportado gran variabilidad de respuesta superovulatoria y producción de embriones en varias especies (Amstrong, 1993). De hecho, ya se describió que “la superovulación como método para obtener embriones ha tomado muchas formas a lo largo de los años; sin embargo, todavía deja mucho que desear”. Esto se ha convertido en un problema importante que bloquea el progreso en la explotación de la transferencia de embriones. Aunque se han realizado progresos considerables recientes en el estudio de la fisiología y manipulación ovárica, así como en la bioquímica de las gonadotropinas, los factores inherentes al animal donante que afectan la respuesta superovulatoria solo se entienden en parte. Por lo tanto, todavía existe un alto grado de respuesta propio de cada animal imprevisible después de más de 35 años, creando problemas que afectan la eficiencia y la rentabilidad de la transferencia comercial de embriones.

Números foliculares y respuesta superovularía

Monniaux *et al.*, (1983), sugirieron que la cantidad de folículos presentes en el ovario en el momento de los tratamientos con gonadotropinas afecta la respuesta superovularía en el ganado. Ellos identificaron dos clases de vacas que responden mal a los tratamientos superovulación. El primer grupo de hembras tenía de 50 a 200 folículos en crecimiento por ovario, con un diámetro $<0.7\text{mm}$, en comparación con animales que presentaban 600 o más



folículos en los ovarios, quienes respondieron bien a los protocolos. La segunda clase de vacas que no respondieron tenía una gran cantidad de folículos, pero muchos de ellos sufrían atresia en el momento en que se iniciaron los tratamientos con gonadotropinas. Las vacas en este último grupo pudieron haber respondido bien a la sobre estimulación si los tratamientos con gonadotropinas se hubieran iniciado en el momento de la aparición de la onda folicular. Sin embargo, el primer grupo de animales podría no haber tenido una población de folículos lo suficientemente grande; en consecuencia, esta condición podría no estar sujeta a mejora (Monniaux *et al.*, 1983)

Estas primeras observaciones se confirmaron recientemente en estudios en los que se informó que el número de folículos en las ondas ováricas en el ganado eran muy variable entre animales, pero muy repetibles dentro de los individuos (Ireland *et al.*, 2007). Por ejemplo, se ha informado que el número máximo de folículos durante diferentes ondas foliculares de un ciclo estral es tan bajo como 8 en algunos bovinos, pero tan alto como 56 en otros (Burns *et al.*, 2005). Además, se demostró que las vacas con un número relativamente elevado de folículos tenían concentraciones séricas de inhibina más altas, pero concentraciones más bajas de FSH y concentraciones de estradiol similares durante la primera onda folicular en comparación con las vacas con un número bajo de folículos (Villavicencio *et al.*, 2007). Singh *et al.* (2004), han informado diferencias en la respuesta superovulatoria entre las vacas que tenían más de 30 folículos de 3 a 5 mm en comparación con las que tenían menos de 30 folículos. Del mismo modo, Ireland *et al.*, también informaron que las vaquillas de carne con un número bajo de folículos (<15 folículos de >3 mm de diámetro) en el momento de la aparición de la onda también tenían una respuesta



superovulatoria menor que aquellas con un alto número de folículos (es decir, >25 folículos) en la emergencia de onda.

Por lo tanto, podría ser posible seleccionar vacas donantes en función del número de folículos presentes en el momento de la aparición de la onda folicular mediante ultrasonografía. También es digno de mención que la tremenda variación en el número de folículos entre animales podría ser la razón por la cual los protocolos de tratamiento actuales no han logrado aumentar el número de embriones transferibles por tratamiento de superestimulación. Aunque la sincronización de la aparición de ondas foliculares puede ser crítica en vacas con un número medio o bajo de folículos (es decir, vacas con menos de 15 y entre 15 y 25 folículos por onda), el efecto podría no ser tan evidente en vacas con más de 25 folículos ingresados la onda del folículo y podría ser confundida por nuestra incapacidad de recuperar todos los embriones presentes en el útero después de la superovulación. Recientemente, se informó que el número de folículos podría estar asociado a las concentraciones circulantes de hormona Antimülleriana (AMH) (Ireland *et al.*, 2011, Monniaux, 2012).

Hormona Antimülleriana (AMH)

Es una glicoproteína de 140 kDa que pertenece a la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF β). En mamíferos, la AMH es producida exclusivamente por las gónadas, específicamente por las células de Sertoli en el macho y células de la granulosa de folículos ováricos en crecimiento en la hembra (Vigier, 1984).



Inicialmente se estudió la AMH en la especie humana, llegando a la conclusión que las concentraciones circulantes de AMH se asocian positivamente con el número total de folículos ováricos existentes en ese momento, llegando a constituirse en una de las pruebas más confiables de la capacidad reproductiva de la mujer (Fanchin *et al.*, 2003).

En los bovinos se determinó que las células de la granulosa comienzan a expresar la AMH en folículo que inicia su crecimiento y que esta expresión disminuye en los folículos en desarrollo terminal (Ireland *et al.*, 2011, Rico *et al.*, 2009, Monniaux *et al.*, 2010).

Desde entonces se viene trabajando en utilizar la AMH, como un marcador endocrino confiable de la población de pequeños folículos antrales sensibles a la gonadotropina (Peña & Correa, 2018). Esta información puede ser usada como un predictor del número de embriones que una donante puede producir (Anduaga *et al.*, 2015).

Papel de la AMH en la mujer

Hay estudios realizados en roedores que demuestran que la expresión de la AMH comienza inmediatamente después del proceso de reclutamiento, cuando las células de la pregranulosas de los folículos primordiales son planas y se diferencian en células granulosas cilíndricas. La expresión es aún mayor en las células granulosas de los folículos preantrales y antrales pequeños, y luego va disminuyendo con los estadios subsiguientes del desarrollo folicular. En los estadios dependientes de FSH y en los folículos atrésicos ya no se observa la expresión de la AMH (Durlinger, 2002). Estudios que valoraron la dinámica folicular y el rol de la AMH se han realizado en ratones deficientes de la AMH (AMH-null mice). En los ovarios de estos ratones de 4 meses de edad se encontraron el triple de



folículos en crecimiento que en los ratones que contenían AMH (wild-type mice) acompañado de una disminución del pool de folículos primordiales (Unger S, 2010). El aumento del número de los folículos en crecimiento había comenzado ya a los 25 días post-natales, previo al comienzo del ciclo estrogénico. Este aumento del reclutamiento provocó luego de unos meses, a los 13 meses de edad, un agotamiento prematuro del pool de folículos primordiales. Tomando como referencia de ovulación la presencia del cuerpo lúteo, se comprobó que el 56% de los AMH-null mice habían dejado de ovular a los 16-17 meses de edad, mientras que el 82% de los wild-type mice continuaban ovulando. Estos resultados indicarían que la AMH tendría un efecto inhibitorio en el reclutamiento folicular y que, en ausencia de ésta, la tasa de reclutamiento se produce en forma más acelerada. Basado en los bajos niveles de FSH adosados en los AMH-null mice, en comparación a los niveles de FSH encontrados en los wild-type mice, y el gran número de folículos en crecimiento, se puede decir que en ausencia de la AMH los folículos son más sensibles a la FSH. En cultivos de células granulosas la AMH inhibe la inducción de la FSH sobre la actividad de la aromatasa y la expresión del receptor de LH. Estudios in vivo en los cuales se fueron agregando diferentes concentraciones de FSH observaron mayor número de folículos en crecimiento en los AMH null-mice que en los wild-type mice, tanto con bajas como altas dosis de la misma (Durlinger, 2001). Este efecto inhibitorio de la AMH sobre la sensibilidad de los folículos a la FSH parecería jugar un rol en el proceso de selección. Se cree que cada folículo posee su propio umbral a la concentración de FSH que tiene que ser superado para permitir la selección del mismo. Algunos folículos presentan una menor expresión de AMH que otros. Éstos serán más sensibles a la FSH (disminuye el umbral a la FSH) y continuarán su crecimiento para poder ser ovulados en el ciclo siguiente (Visser,



2012). A pesar de que la mayoría de los estudios están basados en roedores, los hallazgos también pueden aplicarse al ovario humano (Carlsson *et al.*, 2006). Si bien se observa la expresión de AMH en los folículos primarios de los ratones a los 3 ó 4 días post-natales, en las mujeres la expresión de la misma puede observarse en las células granulosas de los folículos primarios a partir de las 36 semanas de gestación (Rajpert *et al.*, 1999). Recién en la vida postnatal y en los folículos preantrales y antrales pequeños (≤ 4 mm) la expresión es aún mayor. La expresión de AMH continúa en los folículos en crecimiento y desaparece cuando éstos alcanzan un tamaño en el que pueden ya ser seleccionados por la FSH. En el ratón ocurre en el estadio antral temprano (Durlinger *et al.*, 2002), mientras que en la mujer ocurre cuando los folículos alcanzan un tamaño de 4-6 mm. En los folículos atrésicos y en las células de la teca no se observa expresión de AMH (La Marca *et al.*, 2006).

En un estudio realizado por Cook *et al.*, el año 2000 se midieron los niveles séricos de AMH en tres fases diferentes del ciclo menstrual (folicular, ovulatoria y lútea), observando una mínima fluctuación (Cook, 2000). Esto puede explicarse por el continuo crecimiento de los folículos pequeños que producen AMH. Se les extrajo sangre a doce mujeres sanas y jóvenes (18-24 años) a lo largo de un ciclo menstrual y se midieron los niveles de FSH, LH, estradiol, progesterona, inhibina B y AMH. Los niveles de AMH en los primeros días del ciclo (días -14 a -12) fueron de $3,8 \pm 1,2$ ng/ml. No se observaron cambios significativos de la AMH a través del ciclo. El valor más alto fue de $3,9 \pm 1,3$ ng/ml en el día - 12 y el menor valor fue de $3,4 \pm 1,1$ ng/ml en el día 14, y la diferencia no fue significativa (La Marca *et al.*, 2006). El resto de las hormonas que fueron estudiadas demostraron variaciones significativas a lo largo del ciclo menstrual ya que forman parte de un complejo



sistema de retroalimentación del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. Un marcador sérico que no se encuentre bajo el control gonadotrófico, como lo es la AMH, sería un candidato ideal para evaluar la actividad ovárica. En trabajos se estudiaron los niveles de FSH, LH, estradiol y AMH a lo largo de un ciclo menstrual de 44 mujeres y las conclusiones fueron similares a las del estudio de Cook. Las variaciones de AMH en un ciclo menstrual normal son mínimas, por lo tanto, un solo dosaje de AMH en cualquier momento del ciclo es válido para estudiar la actividad ovárica de aquellos folículos que fueron reclutados, pero que aún no fueron seleccionados para ser dominantes. Previa y posterior a estos dos puntos la AMH no se expresa. Esto indica que la AMH jugaría un rol importante tanto en la regulación del número de folículos en crecimiento (inhibiendo el reclutamiento) como de su selección para ser ovulados (inhibiendo a la FSH). De esta manera se convierte en un marcador clave del tamaño del pool folicular. Ahora bien, ¿en qué momento del ciclo debemos solicitar la AMH? Varios son los trabajos que encontramos, pero hay algunas controversias al respecto. Si bien Wunder y col. concluyen que los niveles de AMH durante el ciclo menstrual presentan cambios estadísticamente significativos (Wunder *et al.*, 2007), el resto de los trabajos no coinciden con esto.

AMH en el ganado bovino

En la vaca la AMH se encuentra en los folículos preantrales, folículos antrales pequeños en crecimiento, así como en las células de cumulus oophorus. Pero resulta ser indetectables en los folículos primordiales antes de la activación de su crecimiento. Se ha encontrado que en los rumiantes la concentración de AMH disminuye marcadamente cuando incrementa el



tamaño del folículo, teniendo grandes concentraciones de AMH folículos entre 3 – 7 mm y bajas concentraciones en folículos < 7 mm de diámetro (Monniaux *et al.*, 2013).

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

Utilidad de AMH

La concentración sérica de AMH en el ganado adulto resulta ser relativamente constante, sin presentar variaciones significativas en el ciclo estral o incluso en la sincronización de celo (Mossa *et al.*, 2017). Por lo que puede ser un biomarcador confiable que refleja el RFA, tamaño del ovario y la cantidad total de folículos y ovocitos en ovarios de los bovinos (Ireland *et al.*, 2011).

AMH y respuesta superovulatoria

En vacas productoras de carne se puede asociar la respuesta superovulatoria con la concentración sanguínea de AMH, ya que se obtuvo que las vacas con mayor número de



folículos de 3 – 5 mm al comienzo de la superovulación tienen mayor concentración sérica de AMH, resultando este mismo grupo de vacas con una mayor cantidad de cuerpos lúteos palpables (Center *et al.*, 2018).

En vacas Holstein también se ha informado que la AMH puede ser utilizada como un marcador para seleccionar donadoras que pueden tener una buena respuesta a SOV (Ginther, 2016), teniendo una correlación positiva entre la concentración de AMH y la cantidad de CL luego de la aplicación del tratamiento hormonal para inducir la superovulación (Rico *et al.*, 2009).

AMH y producción de embriones.

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



Técnica de ecografía transrectal

La evaluación ecográfica del aparato reproductor de los bovinos constituye un punto importante además de la palpación manual. Mediante la ecografía se examina y evalúa el tracto reproductivo. La ecografía transrectal se realiza a través de la introducción del transductor (sonda) en el recto, permitiendo visualizar y evaluar la estructura de los ovarios, el útero y estructuras circundantes. Los transductores de matriz lineal con frecuencias de 7,5 MHz producen imágenes rectangulares que son las más utilizadas. (Durlinger *et al.*, 2002)

Para asegurar un correcto procedimiento el animal debe ser sujetado, retirando el exceso de materia fecal del recto para facilitar el examen del aparato reproductor. El transductor lubricado es colocado dentro de la mano en figura cóncava del operador y se inserta cuidadosamente en el recto para iniciar el examen. El transductor es colocado firmemente en contacto con la cara ventral del recto contra el piso de la pelvis. Todas las estructuras reproductivas internas deben ser identificadas y evaluadas de forma sistemática, visualizando vejiga, cérvix, cuernos uterinos, como puntos de referencia. (Gutiérrez & Sandoval, 2014)

El uso de la ultrasonografía transrectal, nos permite establecer el diagnóstico positivo de gestación en vacas lactantes, determinar probabilidades de preñez de acuerdo a diámetros foliculares (incremento en la tasa de preñez asociado a mayor diámetro del folículo ovulatorio). Por lo tanto, los hallazgos del examen ecográfico siempre deben interpretarse en combinación con los registros del establecimiento, los datos genealógicos y observaciones visuales (detección de celo, por ejemplo). (Gutierrez, 2012)



Ovario en Anestro

El estroma del ovario en anestro tiene ecogenicidad homogénea a la ecografía. Tanto las estructuras asociadas con la actividad cíclica como los folículos y cuerpos luteales no suelen ser visibles. (BCF, 2012)

Ovario Activo

Durante la evaluación ecográfica de un ovario activo podemos encontrar además del estroma, folículos y cuerpos lúteos. Estas estructuras tienen diferente ecogenicidad y por lo tanto aparecen con distintas tonalidades de gris en la ecografía. (BCF, 2012)

Folículos

Los folículos observados por medio de la ecografía muestran una forma típica, circular y lleno de fluido no ecogénico (oscuro). A veces se observa una deformación en la pared folicular, y generalmente se debe a la presencia de un folículo más pequeño. (García *et al.*, 2010)

Cuerpo lúteo

La detección del cuerpo lúteo en vacas con anestro verdadero es algo raro. El cuerpo lúteo (CL) se presenta en las dos terceras partes del ciclo estral. El CL aparece como un área ecogénica clara dentro del estroma del ovario. Es normal ver un hueco central (cavidad llena de líquido) y no debe confundirse con la presencia de un quiste Ovario con folículos (García *et al.*, 2010)



Técnica de ELISA para determinar hormona Antimülleriana

Una de las técnicas utilizadas para determinar concentraciones de hormonas es la técnica de ELISA. La más utilizada es la denominada ELISA en sándwich la cual utilizados anticuerpos reactivos con diferentes epítopes del antígeno cuya concentración se desea determinar. La técnica de ELISA en sándwich se utiliza para identificar un antígeno específico de la muestra. La superficie de los pocillos se prepara con una cantidad límite de anticuerpos conocidos, para capturar el antígeno. Después de la unión no específica se bloquean los sitios libres de la placa utilizando albúmina de suero bovino. Se agrega la muestra a la placa. A continuación, se añade anticuerpo primario específico para el antígeno. Luego se agrega anticuerpo secundario ligado a enzimas, que se unen al anticuerpo primario, conjugados anticuerpo-enzima no unido se eliminan mediante un lavado. Se añade el sustrato que es enzimáticamente convertido y genera un color que puede ser cuantificado. (Durlinger *et al.*, 2001)



MATERIALES Y MÉTODOS.

Materiales.

Materiales Físicos

- Ecógrafo (Aloka ProSound 2[®], Tokyo-Japón)
- Equipo de ELISA
- Jeringas de 10-20 ml.
- Tubos 3k EDTA 4 ml
- Agujas vacutainer
- Cooler
- Torundas de alcohol
- Guantes Nitrilo
- Guantes Ginecológicos
- Cámara fotográfica
- Teléfono móvil

Materiales Biológicos



- Vacas
- Sangre

Materiales Químicos

- Gel
- Alcohol 70%
- Kit de Elisa (kit DL-AMH-b, Develop[®], China)

Materiales de Laboratorio

- Centrifuga
- Pipetas automáticas
- Tubos Eppendorf
- Congelador

Materiales de Oficina

- Cuaderno de campo
- Libreta
- Esferos
- Medios Extraíbles (Memory USB)



La zona posee dos estaciones: la seca y húmeda debido a la fragmentación geográfica que ocasiona la cordillera de los andes, por lo que la región occidental tiene temperaturas que oscilan entre los 20°C y 33°C y la zona andina su temperatura puede variar de los 10°C a 28°C.

Metodología de la investigación.

▪ Unidad experimental y granja

Se evaluaron un grupo de 15 ganaderías en base a características ecológicas de su entorno como: altitud (sobre los 2500msnm), temperatura (entre 7 y 18°C), humedad relativa de 80%, y pluviosidad anual entre 800 y 2000 mm); además, del sistema de manejo (libre), forma de alimentación (pastoreo controlado), a base de mezclas de gramíneas (*Pennisetum clandestinum*), y leguminosas (*Lolium multiflorum*), (*Trifolium pratense*), (*Trifolium repens*), suplementadas diariamente con heno de gramíneas/leguminosas y sales minerales), y que poseían animales de raza Holstein mestizos. Estas ganaderías tenían una media de 25,4±4,1 vacas, con un producción láctea entre 8 y 12 litros/ día.

Del total de 383 vacas existentes en estas 15 granjas se incluyeron 135 hembras multíparas (3,1 ± 0,17 partos), edad media de 5,9 ± 0,22 años, peso de 553,8 ± 12,82 kg y condición corporal (CC) de 2,55 ± 0,05, en una escala de 1 al 5 (Song *et al.*, 2019). Además, todas se encontraban sobre los 60 días pos parto, eran cíclicas, y respondieron al protocolo de reinicio de onda folicular.



concentración de Hormona Antimülleriana y recuento de folículos >3mm. BE=benzoato de estradiol. CIDR=dispositivo de progesterona. PG=prostaglandina. FPO=folículo preovulatorio. US=ultrasonografía RFA=recuento de folículos antrales. MS=toma de muestras de sangre.

Fuente: autores.

Recuento de folículos antrales (RFA).

Para determinar el recuento de folículos antrales, los ovarios fueron escaneados transrectalmente con un ecógrafo provisto de un transductor lineal de 7.5 MHz (Aloka ProSound 2[®], Tokyo-Japón). El día 11 se verificó la desaparición del folículo dominante (ovulación) e inmediatamente se realizó el recuento de los folículos antrales ≥ 3 mm, la técnica de escaneo según lo descrito por Ayala *et al.*, (2019). Esta técnica consistió en un barrido latero-medial, dorso-ventral y cráneo-caudal, primero del ovario derecho y luego el izquierdo. Las valoraciones ecográficas fueron realizadas siempre por el mismo técnico.

Determinación de la concentración plasmática de hormona Antimülleriana (AMH).

El día 11 del protocolo por la mañana (06h00) se procedió a extraer una muestra sanguínea, en tubos al vacío con EDTA (Vacutainer[®]), mediante punción de la vena coccígea. Las muestras fueron colocadas en un cooler con gel refrigerante a 5°C, luego fueron trasladadas al laboratorio de biotecnología para ser centrifugadas a 3000 rpm x 20 minutos y el plasma obtenido se retiró y almacenó en alícuotas a -20°C, hasta el posterior análisis de la AMH.



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

Diseño experimental.

La investigación fue de tipo descriptiva. En un primer momento se determinaron los niveles de hormona Antimülleriana que poseían cada una de las 135 vacas de raza Holstein mestizas, al mismo tiempo se realizó el recuento de folículos antrales presentes en los dos ovarios de cada una de las vacas en estudio.

En segunda instancia y una vez determinado la concentración plasmática de AMH de cada una de las vacas en estudio, fueron divididas en tres grupos de acuerdo con los niveles de AMH: grupo de alto nivel de AMH (>0,09 ng/ml), grupo con nivel medio de AMH (0,05-0,09 ng/ml) y grupo de bajo nivel de AMH (<0,05 ng/ml), esto en base a la metodología descrita por Rico *et al.*, (2012); Ribeiro *et al.*, (2014); Souza *et al.*, (2015), para establecer los niveles de corte de la de los tres grupos de alta, media y baja concentración de AMH. Luego, se procedió a comparar el RFA en cada uno de los grupos en estudio.

Análisis estadístico.

Los resultados fueron almacenados y tabulados en Excel y posteriormente analizados mediante el paquete estadístico SPSS versión®25. Se realizó estadística descriptiva



generales. La normalidad de los datos fue establecida mediante la prueba de Shapiro Wilk. La determinación de los grupos de alta, media y baja concentración de AMH se realizó mediante terciles. Se ejecutó la prueba de ANOVA, y para establecer los puntos de cortes y comparar los valores de cada grupo se utilizó el test de Tukey al 5%. Para determinar correlación entre los niveles de AMH con el RFA se aplicó un análisis de correlación de Pearson y para determinar la asociación entre las dos variables se ejecutó una prueba de regresión lineal simple. Los datos presentados en tablas se expresaron como valores medios \pm desviación estándar y las figuras muestran valores medios \pm error estándar de la media, excepto para el estudio de correlación. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a partir de $p < 0,05$.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1.1 Promedio general de la concentración de hormona Antimülleriana (AMH)

La concentración media plasmática de la hormona Antimülleriana valorada en el momento del reinicio de la onda folicular (día 11), en todas las vacas Holstein mestizas fue de $0,06 \pm 0,03$ ng/ml este valor plasmático se ubicó entre un valor mínimo de 0,03 y máximo 0,16 ng/ml (**Tabla 1**).

Tabla 1. Resumen de los niveles plasmáticos de la hormona Antimülleriana (AMH) y recuento de folículos antrales (RFA), determinados en el momento del reinicio de la onda folicular (día 11), en vacas Holstein mestizas.

Variable	N	\bar{X}	DE	Valores	
				Mínimo	Máximo
<i>Hormona Antimülleriana (AMH, ng/ml)</i>	135	0,06	0,032	0,03	0,16
<i>Recuento de folículos antrales $\geq 3mm$ (RFA, N°)</i>	135	17,26	4,47	7,00	30,00

Los datos se expresan como valores medios \pm desviación estándar (D.E).

Los resultados del rango de AMH determinado en el presente trabajo es similar en su valor mínimo al establecido por Rico *et al.*, (2009), quienes describieron una concentración mínima de 0,025 ng/ml, en vacas Holstein de 4–9 años de edad, valoradas al momento de reinicio de la onda folicular. Sin embargo, el valor máximo (0,228 ng/ml) descrito por Rico *et al.*, es el doble en relación a lo observado en este trabajo (**Tabla 1**). Esta diferencia en el valor máximo de la AMH se incrementó aún más en los estudios realizados por



Gobikrushanth *et al.*, (2017), al valorar vacas Holstein en Canadá, ellos establecieron un rango entre 38,2 pg/ml (0,038 ng/ml) y 774,1 pg/ml (0,774 ng/ml). Hirayama *et al.*, (2017), al valorar vacas de leche negras japonesas establecieron un rango de 0,032 ng/ml y 1,99 ng/ml. Como se puede observar hay coincidencia entre los valores mínimos en los cuatro estudios, pero el valor máximo difiere en todos ellos.

Esta diferencia en los valores máximos de la AMH encontrados en los estudios antes descritos podría ser explicado por el kit de Elisa empleado para valorar la AMH; así Rico *et al.*, (2009), utilizaron el kit DSL, Cergy-Pontoise, France, testado para líquido folicular bovino. Hirayama *et al.*, (2017), el kit Gen II ELISA (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Gobikrushanth *et al.*, (2017), usaron el kit Ansh Labs Bovine AMH ELISA. Y en el presente trabajo se usó el kit de ELISA tipo sándwich, DL-AMH-b (Develop[®]), China. Este criterio es sustentado por los resultados descritos por Fréour *et al.*, (2007) quienes al comparar la determinación de los valores de AMH mediante dos kits (Beckman Coulter y el de DSL), si bien encontraron una estrecha relación lineal entre estos dos kits ($r = 0,84$; $p < 0,0001$). Sin embargo, los resultados (niveles de AMH) obtenidos con el método DSL fueron significativamente diferentes de los obtenidos con el de Beckman Coulter ($p < 0,0001$), así los valores de AMH establecidos con DSL fueron casi 4,6 veces más bajos comparados con los obtenidos con el Beckman Coulter. Ellos concluyen que la gran diferencia entre los dos métodos (kits) se debe a la falta de estándares internacionales para AMH.



1.2 Promedio general del recuento de folículos antrales (RFA)

Al realizar el análisis ecográfico ovárico transrectal el día 11 del protocolo de sincronización se observó que la población media de folículos $\geq 3\text{mm}$ fue de $17,26 \pm 0,38$ folículos, con un rango de 7 a 30 folículos (**Tabla 1**).

El RFA obtenido en el presente trabajo está en concordancia con los valores establecidos por Mossa *et al.*, (2012), quienes describen un promedio de $18,5 \pm 9,0$ folículos, con un rango entre 4-61, en vacas Holstein valoradas en Irlanda, en sistemas de alimentación similares al del presente trabajo. Estos resultados son corroborados por Sartori *et al.*, (2016), quienes en su estudio realizado en Florida (EEUU), al comparar la población de folículos antrales de vacas Holstein y Nelore, al momento del reinicio de la onda folicular, llegaron a determinar un promedio de $12,7 \pm 5,8$ folículos, rango de 5-40 folículos, en vacas Holstein, pero en sistemas de alimentación de ración total mezclada.

Sin embargo, hay trabajos realizados en vacas de raza Holstein que establecen un RFA superior al determinado en la presente investigación, como el descrito por Gobikrushanth *et al.*, (2017), quienes establecieron un rango 6-45 folículos, con un promedio 23 ± 1 folículos, o el realizado por Furukawa *et al.*, (2020), con valores entre 3,4-52,0 folículos, promedio de $27,2 \pm 12,2$.

Esta diferencia en los valores del RFA de los dos trabajos anteriores con nuestro estudio podría ser explicados por los enunciados de Tovío, (2012) y Sartori *et al.*, (2016), quienes describieron que la alimentación y otros factores medioambientales pueden llegar a alterar la función ovárica y por ende el número de folículos antrales pequeños en crecimiento presentes en el momento del reinicio de la onda..

Por lo tanto, a menor cantidad de folículos pequeños en crecimiento menor cantidad de AMH presente, concepto que es fortalecido por el enunciado de Batista *et al.*, (2014) y Guerreiro *et al.*, (2014), quienes describen que la concentración de AMH varía mucho entre razas de ganado y dentro de estas, considerando como patrón fundamental la población de folículos antrales.

1.3 Resultados de la correlación y regresión lineal de la AMH y RFA.

Mediante la prueba de correlación de Pearson se determinó que los niveles plasmáticos de la AMH se relacionaron significativamente con el número total de folículos de $\geq 3\text{mm}$ de tamaño ($r= 0,783$; $p<0,0001$). Además, el 61% de la variabilidad promedio del RFA podría ser explicado por el modelo de regresión lineal ajustada especificado en la **Fig. 3** ($R^2=0,613$).

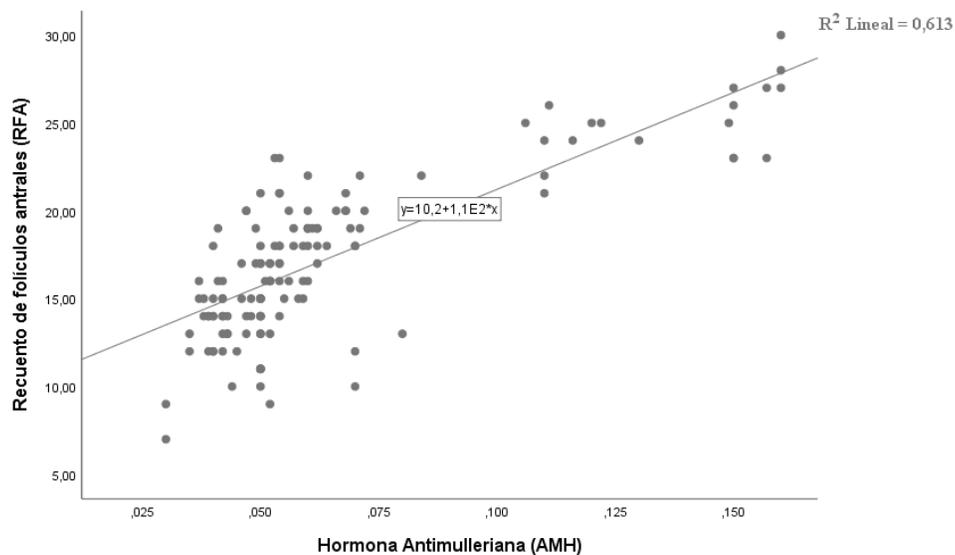


Figura 3. Gráfico de dispersión que representa la asociación entre los niveles plasmáticos de la hormona Antimülleriana (AMH) con el recuento de folículos antrales (RFA).



Rico *et al.*, (2009), llegaron a establecer una correlación entre el RFA y AMH de $r=0,79$; $p<0,001$, similar a la establecida en nuestro trabajo ($r=0,78$; $p<0,001$), a pesar de que el promedio de la AMH en el trabajo de Rico *et al.*, es el doble del determinado en el nuestro ensayo (**Tabla 1**).

Finalmente, autores como Guerreiro *et al.*, (2014), describen la existencia de una asociación lineal entre el RFA y la AMH ($R^2=0,61$; $p<0,001$), y por lo tanto, la cantidad de folículos antrales podrían ser explicados en un 61% por la concentración de AMH. Esta asociación guarda concordancia con lo determinado en el presente estudio ($R^2=0,613$; $p<0,001$; **Fig. 3**).

Por lo tanto, y a pesar de la diferencia en el valor máximo de la AMH determinados, la relación y la asociación entre el RFA y los niveles de AMH mantienen similitud con los diferentes trabajos realizados en la raza Holstein en condiciones de manejo y alimentación diferentes, en el trópico bajo, lo que nos permite establecer que niveles de AMH pueden ser usados como un marcador endocrino de la cantidad de folículos antrales en los bovinos de raza Holstein mestizas, criadas sobre los 2500msnm; sin embargo, se debe tener presente los valores de corte para estos animales.

5.4 Resultados de la correlación y regresión lineal de la AMH y RFA por grupos de baja, media y alta concentración de AMH.

Cuando se agruparon los animales de acuerdo a sus niveles de AMH en bovinos con baja, media y alta concentración de AMH, se observó en los tres grupos correlación positiva y significativa entre el RFA y los niveles de AMH; sin embargo, es importante indicar que la correlación fue más fuerte en los grupos de baja y alta ($r= 0,503$; $p<0,001$ y $r= 0,518$;

$p < 0,023$ respectivamente), comparadas con las observadas en el grupo de media ($r = 0,380$; $p < 0,001$).

Al aplicar la prueba de regresión lineal simple en los tres grupos, se determinó una asociación mayor en los grupos de baja ($R^2 = 0,253$; **Fig. 4**) y alta ($R^2 = 0,269$; **Fig. 6**) concentración de AMH comparado con el grupo de media ($R^2 = 0,144$; **Fig. 5**). Este comportamiento mantiene un patrón similar al observado en los valores de correlación, lo cual nos permite pensar que los grupos de los extremos expresan de mejor manera la relación y asociación lineal simple entre la AMH y el RFA, de tal manera que fue acertada la metodología de utilizar terciles para agrupar los animales.

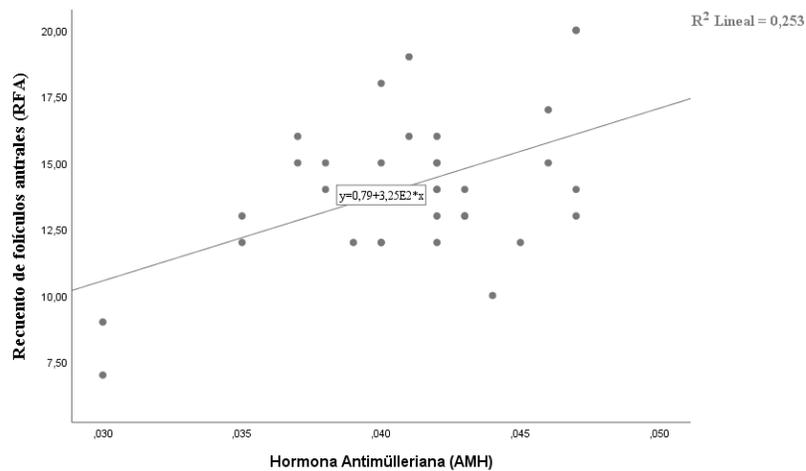


Figura 4. Gráfico de dispersión que representa la asociación entre los niveles plasmáticos de la hormona Antimülleriana (AMH) con el recuento de folículos antrales (RFA) en el grupo de bajo nivel de AMH.

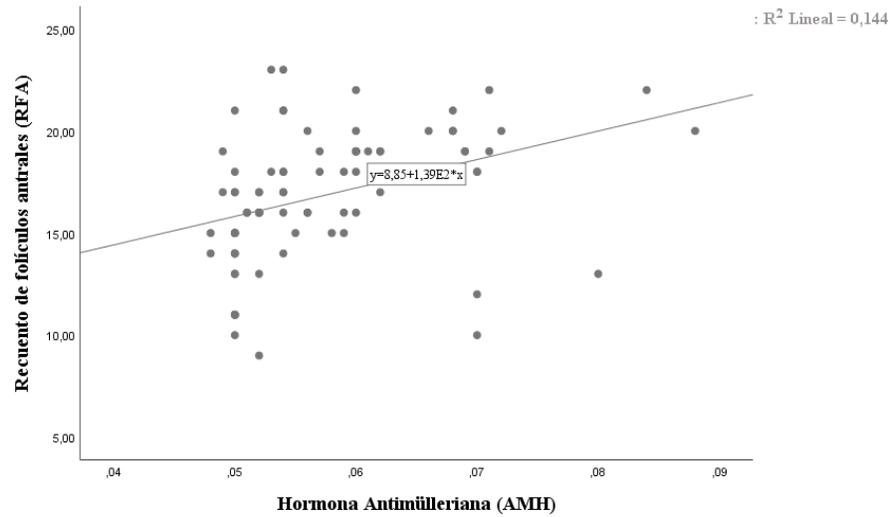


Figura 5. Gráfico de dispersión que representa la asociación entre los niveles plasmáticos de la hormona Antimülleriana (AMH) con el recuento de folículos antrales (RFA) en el grupo de medio nivel de AMH.

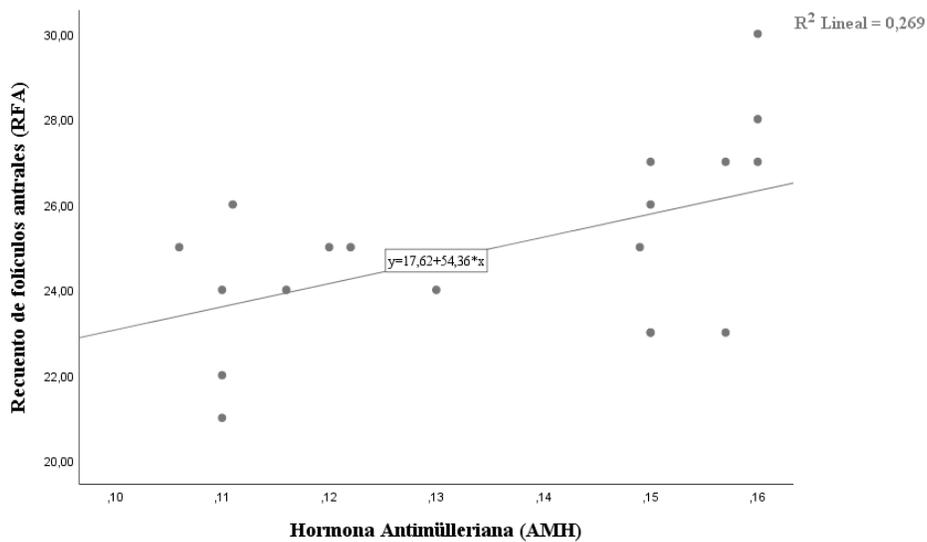


Figura 6. Gráfico de dispersión que representa la asociación entre los niveles plasmáticos de la hormona Antimülleriana (AMH) con el recuento de folículos antrales (RFA) en el

grupo de alto nivel de AMH. Se muestra una línea de regresión lineal simple con su ecuación para facilitar la interpretación de los datos.

1.5 Nivel de hormona Antimülleriana y el recuento de folículos antrales en los grupos de alta, media y baja concentración de AMH.

En segunda instancia las 135 vacas en estudio fueron agrupadas de acuerdo a su nivel plasmático de AMH, en animales con alta (14,07%; n=19), media (58,51%; n=79) y baja (27,40%; n=37) concentración. Se observó en promedio tres veces más AMH ($0,14 \pm 0,02$ ng/ml) en el grupo de alta, en relación al grupo de baja ($0,04 \pm 0,001$ ng/ml; $p < 0,05$; **Fig. 7A**), el grupo de media mostró diferencia en la concentración plasmática ($0,06 \pm 0,01$ ng/ml) de AMH con los otros dos grupos ($p < 0,05$).

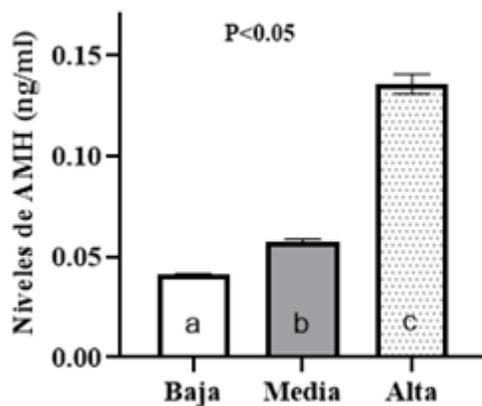


Fig. 7A

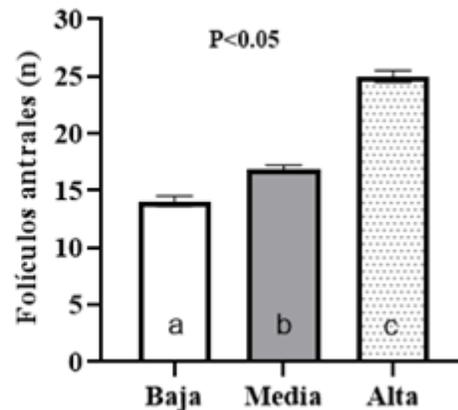


Fig. 7B

Figura 7. Niveles plasmáticos de la hormona Antimülleriana (Figura 7A) y recuento de folículos antrales (Figura 7B) en el día 11 del protocolo de sincronización en vacas Holstein mestizas clasificadas con diferentes poblaciones foliculares: baja ($14,08 \pm 2,68$); media



(16,89±3,22) y alta (25,0±2,21). Los literales a, b y c indican diferencia estadística significativa entre los tres grupos experimentales: $a \neq b \neq c$, $p < 0,05$.

El mayor número de folículos antrales fueron observados en el grupo de alta AMH (25,0 ± 2,21), con respecto al grupo media AMH (16,89 ± 3,22) y al grupo de baja AMH (14,08 ± 2,68; $p < 0,05$ para todos; **Fig 7B**). Asimismo, los grupos de media y baja AMH también mostraron diferencias relacionada a la población folicular ($p < 0,05$).

Autores como Souza *et al.*, (2015), en su trabajo realizado en vacas Holstein, bajo sistema intensivo, con alimentación controlada (RTM), realizado en Wisconsin-USA, propusieron una clasificación de las vacas basado en el nivel de concentración de la AMH, determinado cuatro grupos y considerando al grupo 1 y 4 como animales con bajo nivel de AMH (44,9 pg/ml = 0,045 ng/ml) y alto nivel (243,1 ng/ml = 0,243 ng/ml), respectivamente. Al comparar los promedios de la AMH del grupo considerado de bajo nivel en los dos trabajos, estos fueron similares; sin embargo, el grupo clasificado como de alta concentración de AMH en el experimento de Souza *et al.*, presentó el doble de AMH respecto al mismo grupo del presente estudio (**Fig. 7A**).

Algo llamativo es el hecho de que los valores promedios de la AMH difieren no solo con nuestros resultados, sino también entre estudios realizados en la misma raza (Holstein), en sistemas de explotación similares (intensivos), con un régimen alimenticio controlado, en condiciones medioambientales equivalentes (trópico bajo) como el realizado por Guerreiro *et al.*, (2014), quienes describen un promedio de $0,2 \pm 0,01$ ng/ml para el grupo de baja y $0,4 \pm 0,02$ grupo de alta, estos valores son el doble de los descritos por Souza *et al.*, (2015). Esta gran variabilidad en los resultados encontrados refuerza la hipótesis de obtener valores



de cortes de los niveles de AMH y el RFA para los bovinos de raza Holstein mestizos criados en el trópico alto, manejados bajos sistemas al pastoreo.



CONCLUSIONES.

- Los puntos de corte de la AMH para vacas de raza Holstein mestizas criadas en el trópico alto del Ecuador y alimentadas al pastoreo son diferentes a los establecidos para esta raza en otras condiciones ecológicas y de manejo
- Niveles de hormona Antimülleriana de los animales en estudio mantienen relación fuerte con un mayor número de folículos antrales (RFA) presentes en los ovarios en el momento del reinicio de la onda folicular, situación que coincide con lo descrito a nivel internacional



RECOMENDACIONES.

- Continuar con estudios de la AMH, con la finalidad de establecer un kit de diagnóstico de campo que pudiese ser práctico, económico y de fácil uso.



▪
BIBLIOGRAFÍA.

Abdel Aziz RL, Khalil AAY, Abdel-Wahab A, Hassan NY, Abdel-Hamied E, Kasimanickam RK, Relationship among circulating anti-Müllerian hormone, insulin like growth factor 1, cadmium and superovulatory response in dairy cows, *Theriogenology* (2017), doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.06.007.

Aguirre L, Bermeo A, Maza D, Merino L. Estudio fenotípico y zométrico del bovino criollo de la sierra media y alta de la región sur del Ecuador (RSE). *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA 1* (2011) 392-396.

Amstrong D. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology* 39(1):7–24 · January 1993 DOI: 10.1016/0093-691X(93)90021-V

Anduaga I, Lambrechts P, Genesio K, Grunwaldt M, Cano N, Rautenberg G, Avendaño C, y Vautier R. Hormona Antimülleriana como predictor del potencial reproductivo en bovinos Brangus. *Brangus* (2015), 146-147. Recuperado de: https://issuu.com/aabrangus/docs/revista_bbrangus/148

Ayala L, Duma J. Evaluación de la eficacia de la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) en la determinación de la competencia de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero. (2019). Recuperado de: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/32159/1/TRABAJO-DE-TITULACION.pdf>

Baldrighi J, Filho M, Batista E, Lopes R, Visintin J, Baruselli P and Assumpcao M. Anti-Müllerian Hormone Concentration and Antral Ovarian Follicle Population in Murrah Heifers Compared to Holstein and Gyr Kept Under the Same Management. (2014). *Reprod Dom Anim* 49, 1015–1020 (2014); doi: 10.1111/rda.12430. ISSN 0936–6768

Batista E, Macedo G, Sala R, Ortolan M, Sá Filho M, Del Valle T, Jesus E, Lopes R, Rennó F and Baruselli P. Plasma Antimüllerian Hormone as a Predictor



of Ovarian Antral Follicular Population in Bos indicus (Nelore) and Bos taurus (Holstein) Heifers. (2014). *Reprod Dom Anim* doi: 10.1111/rda.12304. ISSN 0936–6768

BCF Technology Ltd March 2012. *Reproducción bovina. Libro de ultrasonido con Easi-Scan*. Recuperado de: <https://www.imv-imaging.es/media/3627/bcf-bovine-booklet-spanish-low-res.pdf>

Becaluba F. Factores que afectan la superovulación en bovinos [Internet]. Sitio Argentino de producción animal argentino de producción animal. 2007. p. 1–18. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar

Bo G, Mapletoft R. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle *Theriogenology* 81(1):38-48 January 2014. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.020

Burns D., et al. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol Reprod*. 2005 Jul;73(1):54-62. Epub 2005 Mar 2

Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen APN, et al. Anti-müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod* 2006; 21(9):2223-2227

Center K, Dixon D, Looney C, Rorie R. Anti-Mullerian Hormone and Follicle Counts as Predictors of Superovulatory Response and Embryo Production in Beef Cattle. *Adv Reprod Sci* [Internet]. 2018;06(01):22–33. Disponible en: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/arsci.2018.61003>

Cook CL, Siow Y, Taylor S and Fallat ME. Serum Müllerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil Steril* 2000;73:859-861.



Durlinger ALL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, et al. Anti-müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinol* 2001;142:4891-4899.

Durlinger ALL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Themmen APN. Anti-müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endo-crinol* 2002b;143:1076-1084.

Durlinger ALL, Visser JA, Themmen APN. Regulation of ovarian function: the role of anti-müllerian hormone. *Reproduction* 2002a;124:601-609.

Espinoza J, Ortega R, Palacios A, Valencia J, Aréchiga C. (2007). Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interciencia*, 32(2), 93-99. Recuperado en 23 de agosto de 2020, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007000200006&lng=es&tlng=es

Fanchin R, et al. Serum anti-Müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod.* 2003 Feb;18(2):328-32

Fréour T, Mirallié S, Bach-Ngohou K, Denis M, Barrière P, Masson D. Measurement of serum Anti-Müllerian Hormone by Beckman Coulter ELISA and DSL ELISA: Comparison and relevance in Assisted Reproduction Technology (ART), *Clinica Chimica Acta*, 2007 375, (1–2): 162-164, ISSN 0009-8981 <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.06.013>.

Furukawa, E., Masaki, T., Sakaguchi, K., Bo, M., Yanagawa, Y., Ueda, K., & Nagano, M. (2020). Relationship between the timing of the first postpartum ovulation and antral follicle counts in Holstein cows. *Journal of Ovarian Research*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-0610-5>

Ghanem N, Jin J, Kim S, Choi B, Lee K, Ha A, Song S, Kong I, The Anti-Müllerian Hormone Profile is Linked with the In Vitro Embryo Production Capacity and Embryo Viability after Transfer but Cannot Predict Pregnancy Outcome.



Reproduction in domestic animals 51(2), 301-310
<https://doi.org/10.1111/rda.12681>

Ginther O. The theory of follicle selection in cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 2016 Oct;57:85-99. doi: 10.1016/j.domaniend.2016.06.002. Epub 2016 Jun 14

Guerreiro B, Batista E, Vieira L, Sá Filho M, Rodrigues C, Castro A, Silveira C, Bayeux B, Dias E, Monteiro F, Accorsi M, Lopes R, Baruselli P. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domestic Animal Endocrinology* 49 (2014) 96–104

Gobikrushanth M, Purfield D, Colazo M, Butler S, Wang Z, and Ambrose D. The relationship between serum anti-Müllerian hormone concentrations and fertility, and genome-wide associations for anti-Müllerian hormone in Holstein cows. (2017). *J. Dairy Sci.* 101:1–12
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13940>

Gutiérrez, DE. Relación entre el folículo ovulatorio y la tasa de preñez en vacas lactantes. Tesis de Grado. Cúcuta. Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente. Universidad Francisco de Paula Santander. 2012. Recuperado de: <http://alejandria.ufps.edu.co/descargas/tesis/1630008.pdf>

Gutiérrez D, Sandoval G. La ultrasonografía en bovinos. *Respuestas.* 2014; 19(1):99-106. Recuperado de: <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Dialnet-LaUltrasonografiaEnBovinos-5364505.pdf>

Hirayama H, Naito A, Fukuda S, Fujii T, Asada M, Inaba Y, Takedomi T, Kawamata M, Moriyasu S and Kageyama S. Long-term changes in plasma anti-Müllerian hormone concentration and the relationship with superovulatory response in Japanese Black cattle. *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 63, No 1, 2017



Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. INEC. Reporte estadístico del SECTOR AGROPECUARIO. (2011) Recuperado de: https://www.ecuadorencifras.gob.ec/wp-content/descargas/Presentaciones/espac_2010.pdf

Ireland J, et al. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod.* 2007 Jun;22(6):1687-95. Epub 2007 Apr 27

Ireland J, et al. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod.* 2008 Dec;79(6):1219-25. doi: 10.1095/biolreprod.108.071670. Epub 2008 Sep 3.

Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JLH, et al. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod Fertil Dev.* 2011;23(1):1-14. doi: 10.1071/RD10226

Jaques J., Cardoso R., Chachere J., Sinha S., Seery R., Wilkes A., Forrest, D. and Looney, C. (2020) Using Anti-Müllerian Hormone (AMH) as a Predictor of Ova Production for Bovine Embryo Transfer. *Advances in Reproductive Sciences*, 8, 36-47. doi: 10.4236/arsci.2020.81004.

La Marca A, Stabile G, Carducci A, Volpe A. Serum an-ti-müllerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 2006;21(12):3103-3107.



La Marca A, Volpe A. Anti-müllerian hormone in female reproduction: is measurement of circulating AMH a use-ful tool? Clin Endocrinol 2006;64: 603-610.

Lucio R, Sesento L, Bedolla J. Sincronización de celos utilizando GnRH Y PGF2 α para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos productores de leche. Revista de Sistemas Experimentales 3 (7) 60-64 Junio 2016. ISSN-2410-3950. Disponible en: http://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/Sistemas_Experimentales/vol3num7/Revista_Sistemas_Experimentales_V3_N7_7.pdf

Malizia A, Blundo C, Carilla J, Osinaga Acosta O, Cuesta F, Duque A, et al. (2020) La elevación y la latitud impulsan la estructura y la composición de especies de árboles en los bosques andinos: resultados de una red de parcelas a gran escala. PLoS ONE 15 (4): e0231553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231553>

Mapletoft R. Recent advances in superovulation in cattle Reproduction Nutrition Development 42(6):601-11 · November 2002 DOI: 10.1051/rnd:2002046

Monniaux D., et al. Superovulatory responses of cattle. Theriogenology Volume 19, Issue 1, January 1983, Pages 55-81 doi: 10.1016/0093-691X(83)90124-3

Monniaux D; Rico C; Larroque H; Dabiés-Tran R; Médigue C; Clément F; Fabre S. Anti-Müllerian hormone, an endocrine predictor of the response to ovariam stimulation in the bovine species. Gynécologie Ostétrique & Fertilité. 2010;38:465-470. doi: 10.1016/j.gyobfe.2010.05.009

Monniaux D. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. Reprod Fertil Dev. 2012;25:1–16.

Monniaux D, Drouilhet L, Rico C, Estienne A, Jarrier P, Touzé J, et al. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. Reprod Fertil Dev. 2013;25(1):1–16.



Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Carter F, Lonergan P, Smith GW, Ireland JJ & Evans AC. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. (2012). *Journal of Dairy Science* 95 2355–2361. (doi:10.3168/jds.2011-4325)

Mossa F, Carter F, Siobhan W, Walsh D, Kenny G, Smith W, Ireland J, Hildebrandt T, Lonergan P, Ireland J, Evans A. La desnutrición materna en vacas afecta los ovarios y las enfermedades cardiovasculares Systems in Their Offspring, *Biology of Reproduction* 88 (2013), 92, 1–9, <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.107235>

Mossa F, Jimenez-Krassel F, Scheetz D, Weber-Nielsen M, Evans ACO, Ireland JJ. Anti-Müllerian Hormone (AMH) and fertility management in agricultural species. *Reproduction*. 2017;154(1):R1–11.

Nabenishi H, Ohta H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y. Efecto del índice de temperatura-humedad sobre la temperatura corporal y la tasa de concepción de vacas lecheras lactantes en el suroeste de Japón. (2011) *Journal of Reproduction and Development* 57(4): 450-456. <https://doi.org/10.1262/jrd.10-135T>

Ortega V, Dutan J. Ayala L, Rodas R. Caracterización productiva de las ganaderías en los cantones occidentales de la provincia del Azuay. (2017). Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/325542069_Caracterizacion_productiva_de_las_ganaderias_en_los_cantones_occidentales_de_la_provincia_del_Azuay

Parraguez, V.H., Urquieta, B., Pérez, L. et al. Fertility in a high-altitude environment is compromised by luteal dysfunction: the relative roles of hypoxia and oxidative stress. *Reprod Biol Endocrinol* 11, 24 (2013). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-24>



Parraguez, V.H., Gonzalez, A., Endocrinology of reproductive function and pregnancy at high altitudes, *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 11, (2020), 27-32, ISSN 2451-9650 <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.12.006>.

Peña C., Correa, A. 2018. Respuesta superovulatoria asociada a los niveles de hormona Antimülleriana en vacas donadoras. Trabajo de grado. Maestría en Ciencias en Sistemas de Producción Animal. Universidad Autónoma de Baja California. Recuperado de: <http://ica.mx/uabc.mx/mspa/tesis/Pena%20Calderon%20Citlali.pdf>

Perry G, Cushman, R.A. Revisión Invitada: Uso de la ecografía para tomar decisiones sobre el manejo reproductivo^{1,2}. (2016). *The Professional Animal Scientist*. 32 (2): 154-161. <https://doi.org/10.15232/pas.2015-01446>

Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Muller J, et al. Expression of anti-müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3836-3844.

Ribeiro E, Bisinotto R, Lima F, Greco L, Morrison A,† Kumar A,† Thatcher W and Santos J. Hormona anti-Mülleriana plasmática en vacas lecheras adultas y asociaciones con la fertilidad. (2014), *Journal of Dairy Science*. 97 (11): 6888–6900. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-7908>

Rico C, Bontoux M, Clemente N d., Dupont M, Briant E, Monniaux D, et al. Anti-müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol Reprod*. 2009 Jan;80(1):50-9. doi: 10.1095/biolreprod.108.072157. Epub 2008 Sep 10.

Rico C, Drouilhet L, Salvetti P, Dalbiès-Tran R, Jarrier P, Touzé J, Pillet E, Ponsart C, Fabre S, and Monniaux D. Determination of anti-Müllerian hormone



concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. (2012). *Reproduction, fertility, and development*, 24(7), 932–944. <https://doi.org/10.1071/RD11290>

Sakaguchi, K., Yanagawa, Y., Yoshioka, K. et al. Relationships between the antral follicle count, steroidogenesis, and secretion of follicle-stimulating hormone and anti-Müllerian hormone during follicular growth in cattle. *Reprod Biol Endocrinol* 17, 88 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0534-3>

Salazar D, Cuichan M, Ballesteros C, Marquez J, y Orbe D. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) 2017. Recuperado de: https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2017/Informe_Ejecutivo_ESPAC_2017.pdf

Santos J, Cerri R, Sartori R, Nutritional management of the donor cow, *Theriogenology*, (2008) Volume 69, (1) 88-97, ISSN 0093-691X <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.010>.

Sartori R, Gimenes LU, Monteiro Jr PLJ, Melo LF, Baruselli PS, Bastos MR, Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction, *Theriogenology* (2016), doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.016

Segvi R, Erdem H, Karasahin T, Ali M, Satilmis M, Okuroğlu A, Ünal I, Dursun S, Alkan H, Satılmış F, Güler M. Determination of the relationship between serum anti-Müllerian hormone level and superovulatory response in Simmental cows. *Reprod Dom Anim.* 2019; 54:1322–1329. DOI: 10.1111/rda.13506

Silva-Santos K, Santos G, Koetz C, Morotti F, Siloto L, Marcantonio T, Urbano M, Oliveira R, Lima D and Seneda M. Antral Follicle Populations and Embryo Production – In Vitro and In Vivo – of *Bos indicus*–*taurus* Donors from



- Weaning to Yearling Ages. (2014). *Reprod Dom Anim* 49, 228–232 (2014); doi: 10.1111/rda.12255. ISSN 0936–6768
- Singh J. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology*. 2004 Jul;62(1-2):227-43.
- Song, X., Bokkers, E. A. M., van Mourik, S., Groot Koerkamp, P. W. G., & van der Tol, P. P. J. (2019). Automated body condition scoring of dairy cows using 3-dimensional feature extraction from multiple body regions. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 4294–4308. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15238>
- Souza A, Carvalho P, Rozner A, Vieira L, Hackbart K, Bender R, Dresch A, Verstegen J, Shaver R and Wiltbank M. (2015). Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *J Dairy Sci*. 2015; 98(1):169-178. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8182>
- Tovío-Luna N, Duica-Amaya A. Factores relacionados con la dinámica folicular en la hembra bovina. (2012) *Spei Domus*, 8 (17). Recuperado a partir de <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/95>
- Unger S, Beraja H. Hormona antimülleriana. Reserva ovárica y reserva testicular. *Reproducción* 2010; 25:137-153. Recuperado de: http://www.samer.org.ar/revista/numeros/2010/vol25_n3/4_hunger.pdf
- Verratti, V., Di Giulio, C. High-altitude hypoxia and reproduction: is there an environmental limit to the human male reproductive system?. *Sport Sci Health* 7, 39–40 (2012). <https://doi.org/10.1007/s11332-012-0110-0>
- Vernunft A, Schwerhoff M, Viergutz T, Diederich M, Kuwer A. Anti-Muellerian hormone levels in plasma of Hoslstein – Friesian heifers as a predictive parameter for ovum pick-up and embryo production outcomes. (2015). *J Reprod Dev*. 2015 Feb; 61(1): 74-79. Doi: 10.1262/jrd.2014-091



Vigier B. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology*. 1984 Apr;114(4):1315-20.

Visser JA, Jong F, Laven J, Themmen A. Anti-müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 2006;131:1-9 Paigrave K, Ferzola J,. *Reproducción bovina. Libro de ultrasonido con Easi-Scan*. CF Technology Ltd. Buenos Aires. March 2012.

Wunder DM, Bersinger NA, Yared M, et al. Statistica-ly significant changes of anti-müllerian hormone and inhibin levels during the physiologic menstrual cycle in reproductive age women. *Fertil Steril* 2007;87(4):1-7

ANEXOS.

Anexo 1: Trabajo en campo



Foto 1: Ecografía para valorar el recuento de folículos antrales

Fuente: Autor



Foto 2: Ecografía para valorar el recuento de folículos antrales

Fuente: Autor



Foto 3: Toma de muestras de sangre

Fuente: Autor



Foto 4: Almacenamiento de las muestras de sangre

Fuente: Autor

Anexo 2. Materiales y Equipos empleados en Laboratorio



Foto 5: Crioconservador de muestras y Microcentrífuga

Fuente: Autor



Foto 6: Recuperación de plasma para congelación

Fuente: Autor



Foto 7: Procesamiento de las muestras de sangre

Fuente: Autor



Foto 8: Muestras cogeladas

Fuente: Autor



Foto 9: Kit de Elisa para la determinación de los niveles de AMH

Fuente: Autor

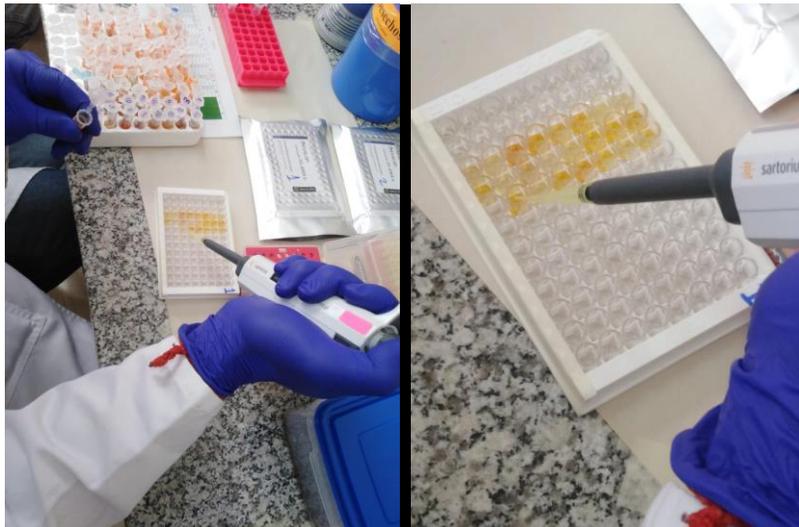


Foto 10: Proceso de valoración de la AMH

Fuente: Autor

