

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Evaluación de los niveles de la hormona anti-mülleriana valorada pre-mortem y su relación con las características morfológicas ováricas observadas post mortem en vacas Holstein mestizas

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

Autor:

Jessica Alexandra Uruchima Uruchima

Director:

Luis Eduardo Ayala Guanga

ORCID:  0000-0001-6543-7594

Cuenca, Ecuador

2023-05-15

Resumen

Esta investigación determinó la relación entre la concentración de la hormona anti-mülleriana (AMH) y el recuento de folículos antrales (RFA) en 80 vacas de raza Holstein mestizas. Los ovarios recuperados fueron trasladados a laboratorio para determinar el peso, tamaño y estructuras presentes en la superficie ovárica (cuerpo lúteo y folículos). En general, la AMH en plasma (pg/mL) tuvo una concentración media (\pm desviación estándar), mínimo y máximo de $280,1 \pm 15,53$; $53,7$ y $580,1$ respectivamente. La media general del RFA visual fue $26,9 \pm 9,49$ folículos y con ecografía fue $20,5 \pm 7,53$ folículos. Las vacas fueron clasificadas en grupos en base al número de RFA (Alto, Medio y Bajo); mediante técnica visual se determinó un promedio de ($36,9 \pm 1,16$) folículos en el grupo Alto; grupo Medio ($23,8 \pm 0,62$) y Bajo ($11,4 \pm 1,13$) con diferencia estadística entre grupos ($p < 0,05$); y con ecografía se encontró en el grupo Alto ($31,4 \pm 0,26$ folículos), grupo Medio ($19,0 \pm 0,41$ folículos) y grupo Bajo ($10,1 \pm 0,69$). El tamaño de ovario derecho (OI) y ovario izquierdo (OD) determinado a través de las dos técnicas (visual y ecográfica) fueron similares ($29,08 \pm 0,51$ mm y $30,03 \pm 0,57$ mm, $p > 0,05$). El peso promedio tanto del OD y el OI fue ($8,18 \pm 0,20$ g); el peso del cuerpo lúteo fue alrededor de los $4,12 \pm 0,19$ g. En conclusión, la concentración de AMH se correlaciona de manera positiva y significativa con el RFA.

Palabras clave: anti-mülleriana, bovinos, ovarios, folículos, ELISA

Abstract

This investigation determined the relationship between the concentration of anti-müllerian hormone (AMH) and the antral follicle count (ARF) in 80 crossbred Holstein cows. The recovered ovaries were transferred to the laboratory to determine the weight, size, and present structures on the ovarian surface (corpus luteum and follicles). In general AMH in plasma (pg/mL) had a mean (\pm standard deviation), minimum and maximum concentration of 280.1 ± 15.5 ; 353.7 and 580.1 respectively. The general average of the visual RFA was 26.9 ± 9.49 follicles, and with ultrasound, it was 20.5 ± 7.53 follicles. The cows were classified into three groups based on the number of RFA (High, Medium, and Low); Using the visual technique the average (36.9 ± 1.16) follicles were determine in the High group; Medium (23.8 ± 0.62) and Low (11.4 ± 1.13) groups with the statistical difference between groups ($p < 0.05$); and with ultrasound, it was found, in the High group (31.4 ± 0.26 follicles); the Medium group (19.0 ± 0.41 , follicles) and the Low group (10.1 ± 0.69). The size of the right ovary (LE) and left ovary (RE) determined by the two techniques (visual and ultrasound) were similar (29.08 ± 0.51 mm and 30.03 ± 0.57 mm, $p > 0.05$). The average weight of both the RE and the LE was (8.18 ± 0.20 g); the weight of the corpus luteum was around 4.12 ± 0.19 g. In conclusion, the AMH concentration positively and significantly correlated with the RFA.

Keywords: anti-müllerian, cattle, ovaries, follicles, ELISA

Índice de contenido

Introducción	12
Objetivos	14
2.1 General	14
2.2 Específicos	14
Revisión de literatura.....	15
3.1 Anatomía del sistema reproductivo bovino	15
3.2 Desarrollo folicular	17
3.3 Fases del desarrollo folicular	17
3.3.1 Folículos primordiales	17
3.3.2 Folículos primarios.....	17
3.3.3 Folículos secundarios	17
3.3.4 Folículo terciario	18
3.4 Dinámica folicular	18
3.4.1 Fases de la dinámica folicular	19
3.5 Ondas de desarrollo folicular	20
3.6 Ciclo estral	20
3.6.1 Fases del ciclo estral	21
3.6.2 Etapas de ciclo estral.....	21
3.7 Regulación neurohormonal del ciclo estral	22
3.8 Hormona anti-mülleriana	23
3.8.1 Estructura de la hormona anti-mülleriana	23
3.8.2 Ventajas de la medición de AMH	24
3.9 Superovulación (SOV) en la vaca lechera.....	24
3.10 Protocolos de superovulación en la vaca lechera	25
3.11 Ultrasonografía en ganado bovino	25
3.11.1 Principios de la ultrasonografía	26
3.11.2 Examen ecográfico	27

3.11.3 Descripción de los órganos reproductivos observados mediante ultrasonografía	27
Materiales y métodos.....	29
4.1 Materiales	29
4.2 Métodos y técnicas empleadas	30
Resultados y Discusión	34
Conclusiones	45
Recomendaciones	46
Referencias	¡Error! Marcador no definido.
Anexos	58

Índice de figuras

Figura 1. Grafica de regresión lineal del recuento de folículos antrales (RFA) y la concentración de la hormona anti-mülleriana (AMH). Panel 1: RFA mediante técnica visual. Panel 2: RFA mediante la técnica ecográfica.36

Figura 2. Media y error estándar del recuento de folículos antrales (RFA) en grupos de Bajo (<15 folículos), medio (entre 16-29 folículos) y alto (>29 folículos). Panel 1= valoración por técnica visual. Panel 2=valoración por técnica ecográfica*=diferencia estadística entre grupos. Prueba de Tukey al 5%.37

Figura 3. Niveles de hormona anti-mülleriana en los grupos de Bajo recuento de folículos antrales (<15 folículos=), medio (entre 16-29 folículos) y alto (>29 folículos). Panel 1: recuento de folículos antrales por técnica visual. Panel 2= recuento de folículos antrales por técnica ecográfica*=diferencia estadística entre grupos. Prueba de Tukey al 5%.38

Figura 4. Media y error estándar Panel 1: de folículos antrales observados en el proestro, metaestro y diestro. Panel 2: nivel de hormona anti-mülleriana en la fase proestro, metaestro y diestro. *=diferencia estadística entre grupos. Prueba de Tukey al 5%.42

Figura 5. Media y error estándar Panel 1: de folículos antrales observados en la fase de reclutamiento, selección y dominancia. Panel 2: nivel de hormona anti-mülleriana en la fase de reclutamiento, selección y dominancia. *=diferencia estadística entre grupos. Prueba de Tukey al 5%.43

Índice de tablas

Tabla 1. Media y desviación estándar general de la concentración de hormona anti-mülleriana (AMH), y el recuento de folículos antrales (RFA) realizado mediante dos técnicas (Visual y Ecográfica).34

Tabla 2. Media y desviación estándar del tamaño del ovario derecho e izquierdo determinado por las técnicas visual y ecográfica; además, peso del ovario derecho e izquierdo establecido por la técnica visual, en los grupos clasificados como de bajo, medio y alto nivel de hormona anti-mülleriana (AMH).....39

Tabla 3. Media y desviación estándar del tamaño (mm) del cuerpo lúteo determinado por las técnicas visual y ecográfica; además, peso (g) del cuerpo lúteo establecido por la técnica visual, en los grupos clasificados como de bajo, medio y alto nivel de hormona anti-mülleriana (AMH).40

Tabla 4. Media y desviación estándar del número de folículos antrales <3mm; entre 3-5mm; entre 5-10mm y >10mm, observados por las técnicas visual y ecográfica, en los grupos clasificados como de bajo, medio y alto nivel de hormona anti-mülleriana (AMH).41

Índice de Anexos

Anexo A. Plantillas para la recolección de datos de los ovarios muestreados	58
Anexo B. Selección de las unidades experimentales.....	59
Anexo C. Muestras sanguíneas recolectadas de la vena yugular de la vaca.	59
Anexo D. Transporte de las muestras sanguíneas recolectadas	59
Anexo E. Muestras sanguíneas centrifugadas.....	60
Anexo F. Muestras congeladas de plasma bovino.....	60
Anexo G. Recolección y almacenaje de los ovarios bovinos.....	60
Anexo H. Medición y pesaje de los ovarios/ folículos	61
Anexo I. Enucleación del cuerpo lúteo	61
Anexo J. Medición del ovario y cuerpo luteo mediante ultrasonografía	61
Anexo K. Medición del nivel de concentración de la hormona anti-mülleriana – Kit de ELISA	62

Agradecimiento

Agradezco en primer lugar a Dios por darme sabiduría y fortaleza para seguir adelante en los momentos difíciles que se presentaron a lo largo de la carrera universitaria.

A mi querida mamá, por ser una mujer luchadora, maravillosa y excelente consejera, pues con su paciencia, sacrificio y entereza me apoyo incondicionalmente para cumplir todas mis metas trazadas. Al mismo tiempo expreso mi sentimiento de gratitud a mi abuelito por sus enseñanzas y su gran amor.

A mi esposo por su paciencia y comprensión, del mismo modo agradezco a cada miembro de mi familia por el apoyo y motivación incondicional, en especial a mi hermano, tías, tíos y primos.

Un agradecimiento muy efusivo a cada uno de mis profesores por compartir sus conocimientos y experiencias a lo largo de mi vida universitaria, agradezco en especial al Dr. Luis Eduardo Ayala, director de tesis, por su paciencia, comprensión y sobre todo por guiarme para ser una excelente profesional.

Finalmente, agradezco a las personas que colaboraron en la ejecución de la tesis, a mis amigos y compañeros, gracias infinitas por todos los momentos compartidos.

Muchas Gracias

Dedicatoria

Dedicada para esa mujer guerrera a la cual admiro y amo, mi querida madre Mariana.

A mi papá/abuelito Gonzalo por ser una gran figura paterna.

A mi esposo por su paciencia y amor incondicional.

A mi hermano Jorge por su compañía y su cariño.

A mis sobrinos Yarelis y Anderson por hacerme reír con sus ocurrencias.

Además, está dedicada a mis queridos tíos y tías, primos y primas, en especial la familia Uruchima Uruchima, Aucaquizhpi Uruchima, ellos me enseñaron que todo sacrificio tiene su recompensa y que Dios siempre camina a mi lado.

Con mucho amor y cariño para ustedes.

Abreviaturas

AMH = Hormona antimülleriana

CL = Cuerpo lúteo

MOET = Multiovulación y transferencia de embriones

OD = Ovario derecho

OI = Ovario izquierdo

OPU = Aspiración ecoguiada

RFA = Recuento de folículos antrales

SOV = Superovulación

Introducción

El progreso de las biotécnicas reproductivas como la multiovulación y transferencia de embriones por ovulaciones múltiples (MOET, por sus siglas en inglés), o la aspiración ecoguiada (OPU, por sus siglas en inglés) se han visto limitadas por la variabilidad individual en las diferentes especies estudiadas, principalmente en lo que respecta al número de folículos antrales disponibles en los ovarios al momento del reinicio de una nueva onda folicular y a la respuesta que estos tienen a los protocolos de superovulación (Ireland et al., 2007).

Varios trabajos han intentado disminuir esta variabilidad individual, identificando animales con alto recuento de folículos antrales (RFA), mediante el uso de la ultrasonografía; sin embargo, esta es una técnica que requiere personal capacitado, equipos costosos de alta resolución e instalaciones adecuadas; además, por lo menos se deben realizar tres ecografías seriadas para que el recuento de folículos antrales (RFA) sea confiable (Perry & Cushman, 2016).

Como alternativa, en los últimos años se ha buscado valorar la concentración de la hormona anti-mülleriana (AMH), glucoproteína que permanece estable durante las diferentes fases del ciclo estral en el bovino y que muestra una relación fuerte con el número de folículos antrales tanto en *Bos indicus* (Silva et al., 2014) como en *Bos taurus* (Souza et al., 2015).

Sin embargo, todos los estudios que han determinado la existencia de esta relación entre el RFA y la concentración de la AMH han sido realizados *in vivo*, donde el RFA fue evaluado mediante ecografía, seguida de la toma de muestras de sangre para la valoración de la AMH y si bien la relación entre el RFA y la AMH en todas fueron positivas; no es menos cierto que el número de folículos antrales en promedio descrito en los diferentes estudios difiere sustancialmente aún en una misma raza como la Holstein (Guerreiro et al., 2014; Souza et al., 2015), y por ende los valores de la AMH.

Esta variabilidad en el RFA existente en los diferentes estudios podría estar ligada a la resolución del ecógrafo, ya que conceptualmente un equipo con una resolución de 3 mm, por ejemplo, permite distinguir dos interfases separadas por 3 mm como dos estructuras diferentes; sin embargo, si la distancia que separa las dos interfases es menor a 2 mm, esta se observará como una sola estructura (Díez, 1992). Por lo tanto, la determinación en forma correcta de folículos menores a 3 mm está influenciada por la resolución del ecógrafo (Rico et al., 2011).

Por lo tanto, sería importante realizar un estudio que valore la concentración de AMH en un animal vivo (sala pre-faenamiento) y luego post mortem para la que se recupere los ovarios para determinar el número de folículos antrales (RFA) existentes en los dos ovarios con la finalidad de observar si la relación entre la AMH y el RFA es similar a los estudios hasta ahora existentes.

Además, si bien existe evidencia científica que determina que los bovinos con un bajo RFA poseen ovarios más pequeños con menor peso y una baja tasa de preñez (Cushman et al., 2009) esta característica se relaciona con una baja respuesta al tratamiento de superovulación y menor número de embriones transferibles obtenidos al final del protocolo, estos animales presentan concentraciones menores de AMH y progesterona circulante (Lima et al., 2020). Sin embargo, trabajos recientes describen lo contrario (Jimenez et al., 2017). Esta controversia en cuanto a los resultados genera la necesidad de profundizar sobre esta relación entre las características de las estructuras ováricas con el RFA y la concentración de la AMH.

Objetivos

2.1 General

Evaluar los niveles de la hormona anti-mülleriana valorada pre-mortem y su relación con las características morfológicas ováricas observadas post- mortem en vacas Holstein mestizas.

2.2 Específicos

- Cuantificar los niveles de la hormona anti-mülleriana en vacas Holstein mestizas pre-faenamiento.
- Relacionar las características morfológicas (tamaño y peso) del ovario y cuerpo lúteo con los niveles de AMH.
- Contabilizar el número de folículos antrales en forma visual agrupados en: <3 mm; entre 3-5 mm; >5 y <10 mm y mayores a 10 mm y relacionarlos con la concentración de AMH.
- Determinar la fase del ciclo estral en la cual se encontraban los animales antes del faenamiento y su relación con los niveles de AMH.

Revisión de literatura

3.1 Anatomía del sistema reproductivo bovino

El sistema reproductivo de la vaca funcionalmente está agrupado en componentes asociados con la producción y transporte de los ovocitos; gestación y cópula (Nabors & Linford, 2015). Es primordial conocer a profundidad las estructuras del tracto reproductivo (ovarios, útero, cuello uterino y vagina) para poder interpretar cambios fisiológicos que ocurren durante el ciclo estral y de las condiciones patológicas (Lefebvre & Gnemmi, 2009).

El ovario bovino es un órgano par primordial del aparato reproductor femenino, tiene como función exocrina la producción de óvulos y endocrina la síntesis de hormonas sexuales, principalmente estrógenos (E2) y progesterona (P4), son ovalados o con forma de almendra cubierta por el epitelio germinal (Hafez, 2002); pudiendo variar la forma debido al crecimiento de los folículos o del cuerpo lúteo; con un diámetro entre 3 a 5 cm y un peso de 14 a 17 gramos (González et al., 2017). Se encuentran situados en la cavidad abdominal en posición craneal con relación al pecten del hueso pubis, sostenidos por el ligamento ancho, específicamente por el mesoovario (Dejarnette & Nebel, 2022).

Está constituido por dos partes, al realizar un corte se puede observar la región medular conocida como zona medullaris o vasculosa conformada por tejido conectivo, nervios, vasos linfáticos y sanguíneos y una región cortical llamada zona parenchymatosa dividida en epitelio, túnica albugínea y la corteza propiamente dicha en donde se encuentran los óvulos rodeados de células foliculares (Nabors & Linford, 2015); cuerpos hemorrágicos, lúteos, corpus albicans y folículos atrésicos (Galina & Valencia, 2008).

El cuerpo lúteo (CL) es una glándula endocrina dinámica y transitoria que se desarrolla al tercer día de la ovulación a partir de las células de la teca interna y la granulosa, con una vida útil alrededor de 17 – 18 días, constituido por 50% de células endoteliales vasculares, 30% de las células luteales esteroideogénicas pequeñas y grandes, además de células inmunes, miocitos, fibroblastos, pericitos y células del músculo liso (Aréchiga et al., 2019).

Es voluminoso, de color amarillo, abarca más de la mitad del tamaño del ovario, la parte externa que sobresale en la superficie del ovario, forma un botón sólido y frágil con 2 cm de alto y entre 1,3 – 2 cm de ancho, puede modificar no solo el tamaño del ovario sino también la forma dependiendo de su localización (González et al., 2017).

Conforme avanza el proceso de degeneración de las células luteales, el cuerpo amarillo reduce su tamaño a la mitad y adquiere un color blanco recibiendo el nombre de corpus albicans el mismo que puede persistir durante varios ciclos estrales (Hafez, 2002).

El desarrollo y funcionamiento normal del CL en los mamíferos está dada por acción de la hormona luteinizante (LH) secretada por la hipófisis anterior, la cual estimula directamente a las células luteales pequeñas mediante la activación del segundo mensajero de la proteína quinasa A para una mayor secreción de progesterona (P4), mientras que las células luteales grandes parecen mediar la acción luteolítica de esta hormona y tienen receptores para la acción de las prostaglandinas (PGF2 α) (Niswender et al., 2000).

Esta glándula es responsable de la duración y regularización del ciclo estral, así como de controlar la ocurrencia de ovulaciones, siendo vital evaluar esta estructura para obtener información relevante sobre el estado reproductivo de la hembra bovina (Wiltbank et al., 2012). Produce P4, hormona trascendental para el mantenimiento de la gestación, si se da la fertilización del óvulo, el CL se mantendrá activo durante toda la preñez debido a que el embrión produce el interferón τ (IFN- τ) sustancia importante para el reconocimiento materno de la gestación, caso contrario el endometrio secreta pulsos de prostaglandina F2 alfa (PGF2 α) produciendo lisis del cuerpo lúteo, es decir, disminuye el flujo sanguíneo hacia el ovario desencadenando así la regresión funcional y estructural del CL al final de cada fase lútea y brindando la oportunidad a la hembra bovina de presentar otro celo con ovulación y la oportunidad de aparearse y concebir nuevamente (Ochoa et al., 2018).

El útero posee dos estructuras denominados cuernos uterinos y un cuerpo; posee 3 capas llamadas mucosa (endometrio), muscular (miometrio) y serosa, se halla sostenido por el mesometrio e irrigado por la arteria uterina (Araújo & Santos, 2007). La función más importante es albergar al embrión y luego al feto dándole protección y nutrición óptima para su desarrollo y participa en la regulación de la función del cuerpo lúteo (Pansani & Beltra, 2009).

El cérvix es una estructura fibrosa con forma transversal dividido por pliegues llamados anillos, estos se abren durante el estro y parto, pues funciona como una barrera natural entre la vagina y el útero; participa en la selección de espermatozoides viables y actúa como reservorio (Araújo & Santos, 2007).

3.2 Desarrollo folicular

El ovario es responsable de la producción de ovocitos y la síntesis de hormonas sexuales, estrógenos y progesterona, que favorecen y regulan la fertilización del óvulo y el mantenimiento de la preñez. Dentro del folículo ovárico se encuentra el ovocito rodeado por las células de la granulosa que facilitan su crecimiento y maduración. Una hembra bovina nace con 200 mil folículos aproximadamente, de los cuales pocos se activan e inician su crecimiento y la mayoría sufre atresia en las diferentes etapas del desarrollo folicular. El desarrollo de los folículos comienza con la formación de los folículos primordiales durante la etapa prenatal, estos folículos se activan y se convierten en folículos primarios y secundarios, pues se mantiene en la etapa preantral independiente de gonadotropinas, pero cuando los folículos forman el antro se conocen como folículos terciarios y depende de las gonadotropinas (Hernández, 2016).

3.3 Fases del desarrollo folicular

Clasificar los folículos ováricos desde el punto de vista morfológico es importante para poder comprender el desarrollo folicular y la atresia.

3.3.1 Folículos primordiales

Están constituidos por un ovocito cuyo diámetro es de 30 μm , no crece, sin zona pelúcida y rodeado por células de la granulosa aplanadas, es decir, su crecimiento se encuentra detenido en la fase de diploteno de la profase I de la meiosis, su forma varía de esférico a ovoide (Filipiak et al., 2016). El número de folículos en el ganado es muy variable al nacer y tienden a agotarse durante el envejecimiento, ya que la reserva ovárica se compone predominantemente de folículos primordiales (Burns et al., 2005).

3.3.2 Folículos primarios

Se caracterizan por presentar un ovocito esférico rodeado por una capa de 11 a 20 células granulosas que adquieren una forma cuboidal y posee un diámetro de 34,7 μm y muestran indicios de formación de la zona pelúcida (Shimizu, 2016).

3.3.3 Folículos secundarios

Poseen 2 o más capas de células granulosas y una pequeña cantidad de células de la teca con capacidad de respuesta a las gonadotropinas (Araújo et al., 2014).

3.3.4 Folículo terciario

Tienen varias capas de células granulosas, células de la teca y un ovocito primario, este ovocito está rodeado por un folículo caracterizado por tener una cavidad antral que contiene líquido folicular rico en estrógenos, aparece en la superficie del ovario como una vesícula transparente llena de líquido, pues ha alcanzado su máximo desarrollo y se convierte en folículo preovulatorio o Graaf siendo la etapa final del desarrollo del folículo (Filipiak et al., 2016).

3.4 Dinámica folicular

La dinámica folicular es un proceso de crecimiento, desarrollo continuo y de regresión de los folículos antrales que conlleva al desarrollo del folículo preovulatorio, este desarrollo folicular ocurre en ondas, pudiendo darse 2 o 3 ondas foliculares involucrando ciertas fases durante el ciclo estral del bovino siendo muy importante conocer la dinámica folicular para poder establecer protocolos de sincronización de celo y/o la ovulación para mejorar la eficiencia reproductiva (Valle, 2008). Esta dinámica folicular ha sido estudiada mediante ultrasonografía y la medición de niveles hormonales, sin embargo, estos resultados sufren variaciones debido a factores como la genética, el estado fisiológico, la nutrición, el clima o el sistema de producción (Restrepo, 2010).

Cada onda folicular involucra ciertas fases iniciando por la fase de reclutamiento folicular, la cual se define como la formación de una cohorte de 5 a 7 folículos con un diámetro 3 a 4 mm; capaces de responder a la hormona folículo estimulante (FSH) para continuar su crecimiento, solo uno de esos folículos reclutados es seleccionado al final de la fase común de crecimiento (fase de selección) para continuar creciendo y convertirse en folículo dominante cuyo tamaño oscila entre 12 – 20 mm y el resto de los folículos subordinados sufren atresia o temporalmente crecen a una velocidad menos y posteriormente dejan de crecer (Burns et al., 2005; Valle, 2008).

El comienzo de cada oleada de crecimiento folicular está precedido por el incremento significativo de la concentración de FSH, para más tarde sufrir un descenso en la concentración de FSH debido a la acción del estradiol secretado por los folículos en crecimiento (Fernández Sánchez, 2008).

3.4.1 Fases de la dinámica folicular

3.4.1.1 Fase de reclutamiento o emergencia

Esta fase ocurre en los días 1 a 3 del inicio de la primera onda folicular, se define como la formación de una cohorte de 5 a 7 folículos con un diámetro ≤ 3 mm con capacidad para responder a la FSH para continuar su crecimiento (Hendriksen et al., 2003). Además, la FSH induce la actividad de la enzima aromatasas sobre las células de la granulosa permitiendo a los folículos producir estradiol a partir de los andrógenos secretados por las células de la teca interna; solo uno de esos folículos reclutados es seleccionado al final de la fase común de crecimiento (Burns et al., 2005).

3.4.1.2 Fase de selección

Los folículos seleccionados deben ser capaces de responder a las gonadotropinas y producir estradiol (E2) en grandes cantidades para liberar el pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH) e inducir la ovulación, pues en las especies monovulares usualmente un solo folículo se convierte en folículo dominante mientras que los otros sufren atresia (Rosales et al., 2012). Este proceso de selección por la caída de los niveles de la hormona folículo estimulante (FSH) que ocurren 2-3 días después de la fase de reclutamiento (Pimenta et al., 2010). Investigaciones recientes en la especie bovina han revelado que los folículos que alcanzan un diámetro de 5 mm pueden suprimir el efecto de la FSH (Aerts & Bols, 2010).

3.4.1.3 Fase de dominancia

Tres días después del crecimiento folicular, el folículo alcanza un tamaño de 8,5 mm y pasa por el proceso de diferenciación denominado desviación permitiendo así que el folículo más grande se transforme en folículo dominante y el resto de folículos subordinados sufran atresia, caracterizando a esta fase por un rápido crecimiento folicular y maduración ovocitaria en el folículo dominante, pues el folículo dominante produce sustancias responsables de la supresión de la liberación de hormona folículo estimulante (FSH) e inhibición de la emergencia de la siguiente onda folicular así como el aumento de la secreción pulsátil de la hormona luteinizante (LH) (Vásquez & Olivera, 2010).

En un experimento con vaquillas se observó que los folículos que están en la etapa de crecimiento, es decir, antes de que pasen por el proceso de desviación, tienen la capacidad de convertirse en un folículo dominante, así lo señalaron los investigadores, reportaron que

al extirpar el folículo más grande justo antes de la desviación, el segundo folículo más grande se convierte en folículo dominante (Aerts & Bols, 2010).

3.4.1.4 Fase de atresia

Los folículos subordinados sufren atresia o temporalmente crecen a una velocidad menor para posteriormente dejar de crecer (Burns et al., 2005).

3.5 Ondas de desarrollo folicular

El ciclo estral contiene 2 o 3 ondas de desarrollo folicular, la primera onda inicia al tercer o cuarto día del ciclo; la segunda onda surge entre el noveno y décimo y en el caso de animales con 3 ondas inicia el día ocho a nueve; en cada onda se origina un folículo de tamaño preovulatorio, pero solo el folículo dominante de la última onda ovula (Boer et al., 2011).

Tanto en la primera o segunda onda, el folículo dominante que no llega a ovular sufre regresión por acción de la progesterona (P4), solo el folículo funcional dominante presente al inicio de la luteólisis se transforma en folículo ovulatorio; generalmente la regresión del cuerpo lúteo (CL) se da en el día 16 (2 ondas) y día 19 (3 ondas) lo que lleva a que un ciclo estral pueda durar entre 19 a 20 días y 22 a 23 días (Boer et al., 2011).

En la segunda onda se pueden detectar folículos de 4 - 5 mm entre los días 0 y 10 para los intervalos interovulatorios y en el día 0, 9 y 16 para los intervalos interovulatorios de tres ondas de actividad folicular (Noseir, 2003).

3.6 Ciclo estral

El ciclo estral se caracteriza por la receptividad sexual de la hembra, este periodo comienza cuando la vaca o novilla presenta celo o estro y concluye con el siguiente estro; en caso de que haya fertilización después de la cópula, el próximo ciclo estral se verá interrumpido por un anestro fisiológico gestacional, pero si no existe gestación el periodo tendrá una duración de 18 – 24 días con una media de 21 días. Durante este proceso la hembra experimenta cambios conductuales, ováricos y endocrinos en su organismo con la finalidad que se dé la ovulación, apareamiento y gestación (Jane, 2016).

3.6.1 Fases del ciclo estral

El ciclo estral en el ganado consta de 2 fases, una fase folicular y una fase lútea, dependiendo de las estructuras predominantes, las mismas que se pueden subdividir de acuerdo a las características endocrinas y conductuales. La fase folicular abarca al proestro y estro, tiene una duración de 4 - 6 días e inicia con la regresión del cuerpo lúteo (CL) y termina con la ovulación, además durante esta fase ocurre la maduración folicular, siendo el estradiol el esteroide gonadal dominante y la fase lútea comprende el metaestro – diestro dura entre 14 - 18 días, durante este tiempo se forma el CL funcional encargado de la secreción de progesterona (P4) (Galina & Valencia, 2008).

3.6.2 Etapas de ciclo estral

3.6.2.1 Estro

Es la más representativa, pues marca el inicio del ciclo estral, el folículo en desarrollo continuamente sintetiza estrógenos por acción de la hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) liberadas por la glándula hipófisis; dichos estrógenos al atravesar el umbral máximo de producción desencadenan cambios en el comportamiento animal y aparición de los signos propios del celo, puesto que la duración del celo o calor es de 16 ± 4 horas en promedio. El principal signo es cuando la hembra se mantiene quieta y se deja montar, es decir, existe receptividad sexual al macho. Además, ocurre aumento de las contracciones del aparato reproductor femenino para facilitar el transporte del esperma y óvulo, mugidos frecuentes, inflamación de la vulva y descarga de un moco transparente rico en feromonas que cautiva y excita al macho (Guáqueta, 2009).

A lo largo del estro, las células de la granulosa se encargan de producir y liberar inhibina para bloquear la acción de la FSH desde la hipófisis (Guáqueta, 2009). Mientras tanto, los valores de LH aumentan luego de la aparición de los signos del celo e inicia el proceso de ovulación. Una vez, que ha iniciado el celo (12 - 24 horas) inmediatamente, el sistema nervioso central de la hembra se vuelve refractario a la acción de los estrógenos y desaparecen las manifestaciones de calor (Rippe, 2009).

3.6.2.2 Metaestro

Inicia cuando termina el estro y dura aproximada de 3 - 4 días, es el periodo de formación de la glándula endocrina llamada cuerpo lúteo (CL) a partir de los restos del folículo ovulado (Atuesta & Gonella, 2011).

El CL libera progesterona (P4) hasta alcanzar niveles de 1 ng/mL, asumiendo así que esta glándula llega a la madurez, no obstante, el organismo toma como criterio fisiológico la finalización del metaestro cuando la concentración de progesterona sobrepasa 1 ng/mL. De igual manera, durante esta etapa ocurre un acontecimiento hormonal que desata la primera oleada de desarrollo folicular debido al pico posovulatorio de FSH. Un signo muy notorio que se observa en el 50% de las vacas es la presencia de un hilo de sangre por la vulva conocido como sangrado metastral (Hernández, 2016).

3.6.2.3 Diestro

A este periodo le caracteriza la prevalencia de la actividad de la progesterona (P4) por parte del cuerpo lúteo, pues es la etapa más larga de este periodo, comienza el día 5 o 6 del ciclo cuando el organismo detecta por primera vez en el torrente sanguíneo una gran concentración de progesterona y finaliza con la regresión del CL mediante un proceso luteolítico entre el día 16 o 17, durante este periodo el útero se prepara para anidar a un nuevo ser (Brito, 2009).

3.6.2.4 Proestro

Se define por la ausencia de un cuerpo lúteo funcional del ciclo anterior y la maduración de un folículo ovulatorio, esta fase puede durar de 2 - 3 días con un aumento de secreción de LH que lleva a la maduración del folículo ovulatorio así como el incremento de los niveles de estradiol e inhibina que regularán constantemente la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH). Además, la creciente producción de estrógenos inicia la preparación del aparato reproductor para el apareamiento, desencadenando cambios en el útero, glándulas endometriales y vagina, coincidiendo al final de esta etapa con el estro mostrando a la hembra sexualmente receptiva al macho (Hernández, 2016).

3.7 Regulación neurohormonal del ciclo estral

El ciclo estral está regulado por una relación recíproca entre el hipotálamo – hipófisis – ovario – útero, cada una de estas estructuras liberan hormonas indispensables para la regulación neuroendocrina del ciclo. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) que a su vez provoca tanto la liberación de tres hormonas primarias de la reproducción; la hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y la prolactina (Hafez, 2002). La LH interviene en el proceso de esteroideogénesis ovárica, ovulación, formación y función del cuerpo lúteo (CL), y la FSH es responsable del

crecimiento y maduración folicular. La prolactina tiene efecto estimulante sobre el crecimiento de la glándula mamaria y la síntesis de leche (Bearden & Fuquay, 1982).

Por otra parte, el ovario sintetiza hormonas esteroideas como estrógenos (E2), progestágenos (P4) e inhibina y el útero se encarga de la síntesis de prostaglandina F2 alfa (PGF2 α) importante en la regresión del cuerpo lúteo y parto (Hafez, 2002).

3.8 Hormona anti-mülleriana

La hormona anti-mülleriana (AMH) conocida también como inhibidor de la sustancia mülleriana, fue mencionada por primera vez por Alfred Jost en 1847, quien demostró que se trataba de una proteína inhibitoria de los conductos de Müller. En los machos es secretada por las células de sertoli y en las hembras pos natales se secretaba a partir de las células de la granulosa de los folículos antrales y antrales pequeños, no siendo hasta hace 20 años que se catalogó como biomarcador cuantitativo confiable para la evaluación de la función ovárica (Park et al., 2014; Sabuncu et al., 2019)

3.8.1 Estructura de la hormona anti-mülleriana

Es una glicoproteína dimérica con un peso molecular de 140kDa correspondiente a 553 – 575 aminoácidos y pertenece a la familia del factor de crecimiento transformante beta, está involucrada en el crecimiento y diferenciación celular (Gautam et al., 2021), producida por las células de la granulosa de los folículos antrales o preantrales tempranos en la hembra bovina, necesita dos receptores para su funcionamiento (AMH tipo 1 y AMH tipo 2); estos se hallan en mayor cantidad en las células de la granulosa de los folículos pequeños cuyo tamaño oscila entre 5 - 8 mm (Alward & Bohlen, 2020). Empieza a expresarse tan pronto como se reclutan inicialmente los folículos, adquiere niveles más altos en los folículos preantrales y antrales pequeños, mientras que luego disminuye conforme avanza el crecimiento del folículo seleccionado hacia la etapa preovulatorio (Mossa et al., 2017)

Esta hormona es secretada en el torrente sanguíneo, la cual puede ser medida mediante un examen sanguíneo, aumenta significativamente hasta la pubertad, luego gradualmente desciende de manera lenta durante el resto de la vida, pues esta disminución se produce de forma paralela con el número de folículos ováricos en crecimiento (Gautam et al., 2021). Los niveles bajos indican envejecimiento ovárico y niveles altos fertilidad; con variación mínima a lo largo del ciclo estral y una elevada repetibilidad en el animal (Hirayama et al., 2012)

La expresión de AMH plasmática se ha estudiado en innumerables especies como; ovejas (Bézar et al., 1987); perros (Nagashima et al., 2016); porcinos (Almeida et al., 2018); pudiendo ser medida también en el líquido folicular de los folículos preovulatorios recuperados en la fertilización *in vitro* (FIV) y transferencia de embriones (TE), pues aquellos folículos con concentración alta de AMH tienden a liberar un ovocito con mayor capacidad reproductiva (Tarasconi et al., 2017).

Además, puede ser un factor que dicta en qué etapa el folículo comenzará a responder a la FSH y actúa en el proceso de selección, asegurando de esta manera que cada folículo antral pequeño produzca una cantidad adecuada de estradiol antes de la selección (Rosa et al., 2018). Asimismo, puede ayudar a particularizar los protocolos de estimulación ovárica, brindando mayor seguridad y eficacia en la FIV (Meczekalski et al., 2016).

3.8.2 Ventajas de la medición de AMH

La medición de AMH ofrece varias ventajas sobre los marcadores hormonales convencionales de la reserva ovárica, como la hormona estimulante del folículo, el estradiol o inhibina B (Sonigo et al., 2019). Pues predice el número de folículos antrales y en consecuencia la respuesta superovulatoria a las gonadotropinas y la fertilidad futura, estudios recientes en terneras (2 - 4 meses) demostraron que el nivel de hormona anti-mülleriana predecía la recuperación de ovocitos y la producción de embriones *in vitro* (El-Sheikh Ali et al., 2017) y las vaquillas con niveles bajos de AMH tienen mayor probabilidad de poseer menor tasa de concepción; ser sacrificadas después que nazca su primer ternero, menor longevidad del hato (Mossa et al., 2017) y sobre todo el nivel más bajo de producción de leche en la primera lactancia (Jimenez et al., 2015).

3.9 Superovulación (SOV) en la vaca lechera

El incremento fisiológico del número de ovulaciones en la hembra bovina a través de la aplicación de gonadotropinas se conoce como superovulación, considerando como una respuesta buena al tratamiento cuando existen más de 2 ovulaciones (Mogollón et al., 2013). Esta biotecnología posee una alta variabilidad lo que dificulta el crecimiento de la tasa de producción de embriones, dicha variabilidad podría estar relacionada con factores externos o internos; respuesta al tratamiento de SOV, dinámica folicular de la donante, tamaño de la población folicular y el número de ondas foliculares respectivamente (Pérez et al., 2019).

Pues el costo de las hormonas usadas en la sincronización y superovulación de la donante es alto (Mogollón et al., 2013); por ello conocer el potencial superovulatorio de la hembra

donante favorecería en la toma de decisiones de someter o no a la hembra a un programa de superovulación (Jaton et al., 2016).

En aquellas hembras bovinas cuyo número de folículos antrales fue más alto, mayor era la respuesta a la superovulación debido a que los niveles de fertilidad son mejores y como consecuencia se acortan los días abiertos (Sakaguchi et al., 2019). Pues se ha vuelto un reto optimizar la fertilidad de la vaca lechera lactante (Thatcher, 2017).

3.10 Protocolos de superovulación en la vaca lechera

Al existir una gran variabilidad en la respuesta a los protocolos de superovulación, se ha buscado la manera de modificarlos sin comprometer la producción de embriones (Bó et al., 2010). Con la finalidad de obtener un mayor número de crías saludables con un gran potencial genético (Durocher et al., 2006).

Pues al no iniciar en el momento de la aparición de la onda folicular, la respuesta superovulatoria se verá reducida significativamente (Pérez et al., 2019). Obteniendo una mejor respuesta al iniciar el protocolo el mismo día de la aparición de la onda folicular, sin embargo, estos protocolos convencionales poseen dos inconvenientes; primeramente la necesidad de tener un personal capacitado en la detección de celo y luego que todas las donantes se encuentre en estro al mismo tiempo para iniciar el tratamiento (Bó et al., 2010).

Aquellas hembras donantes que poseen una baja población de folículos antrales al inicio del tratamiento con hormona folículo estimulante (FSH) producen un número limitado de embriones (Durocher et al., 2006). Asimismo, existe la necesidad de aplicar FSH dos veces al día durante 4 o 5 días consecutivos para lograr la superestimulación ovárica, pero dichos protocolos pueden fallar debido a la falta de atención del personal, mal manejo de las hormonas u horario inapropiado a más del estrés generado en las donantes con una disminución de la respuesta superovulatoria y/o variación en el pico preovulatorio de la hormona folículo luteinizante (Bó et al., 2018).

La FSH tiene una vida media corta, siendo necesario la administración intramuscular de 6 a 8 veces con intervalos de 12 horas entra cada dosis con el propósito de desarrollar muchos folículos y pueda darse una ovulación múltiple (Mogollón et al., 2013).

3.11 Ultrasonografía en ganado bovino

La ecografía reproductiva es una modalidad de diagnóstico no invasiva utilizada en medicina veterinaria, inicialmente para el examen del tracto reproductivo y para detectar su

estado patológico, sin embargo, en los últimos 20 años se han descrito muchas otras aplicaciones en el campo de la medicina bovina (Blon & Buczinsk, 2009).

La aplicación de la ultrasonografía ha revolucionado la biología reproductiva, gracias a las imágenes obtenidas se logra observar de forma más directa y no invasiva los diversos procesos reproductivos en la hembra bovina desde la detección temprana de preñez, gestaciones gemelares, patologías ováricas y como tecnología complementaria en los procedimientos de transferencia de embriones; dinámica folicular ovárica, función del cuerpo lúteo, determinación del sexo; preselección de vacas donantes (Fricke, 2002; Medan & El-aty, 2010).

La ecografía transrectal efectúa con mayor precisión diversos diagnósticos reproductivos (Colazo & Kastelic, 2014). Esta técnica posee una sensibilidad y especificidad de un 97% cuando se realiza el diagnóstico de gestación entre los días 21 y 35 después de una inseminación artificial (Bagley et al., 2023).

3.11.1 Principios de la ultrasonografía

La ultrasonografía es una técnica donde el sonido de las ondas atraviesa las interfases tisulares y los ecos de los tejidos son mostrados en una pantalla, en medicina veterinaria se usan ondas sonoras de alrededor de 3,5 MHz; 5 MHz y 7,5 MHz. Cada una de estas sondas contiene una serie de piezocristales cuya función es convertir ondas eléctricas en ondas sonoras y viceversa; pues los mismos cristales actúan como transmisores y receptores a la vez. En reproducción bovina, la sonda lineal es la más usada en ecografía transrectal por sus cristales piezoeléctricos en filas, transmite ondas de ultrasonidos de mayor frecuencia (5 MHz a 7,5 MHz) produciendo imágenes de mayor detalle, estas imágenes suelen ser rectangulares y a veces sectoriales (Jyoti et al., 2019).

En todo caso la amplitud o intensidad del eco define el brillo de las imágenes en el ultrasonido, por consiguiente un tejido u órgano hiperecogénico aparecerá brillante en la pantalla, al igual que un objeto anecogénico se observara oscuro en la imagen ecográfica pudiendo observarse colores intermedios en una escala de grises que va desde el negro al blanco (Gutiérrez et al., 2014).

Con base a la textura del tejido, el ecógrafo emitirá una imagen pudiendo ser anecogénica (color negro) estructuras como los folículos, saco vitelino debido a que contienen líquido en su interior; si en la imagen se observan estructuras de color blanco (huesos y aire) se denomina ecogénica, por el contrario, aquellas estructuras blandas según la escala de

grises se denomina hipoecogénico (cuerpo lúteo) e hiperecogénica (huesos del feto) (Gutiérrez et al., 2014)

3.11.2 Examen ecográfico

El examen ecográfico de los órganos reproductivos de la hembra bovina se realiza por vía transrectal con un transductor lineal, pero la captación de óvulos y ablación folicular se efectúa vía transvaginal con un transductor sectorial (Fricke, 2002). Antes de iniciar un examen ecográfico se debe restringir al animal para evitar daños del equipo y/o personal y errores en la interpretación de las imágenes debido al movimiento abrupto, es necesario evacuar el recto, pues la materia fecal tiende a reducir la calidad de las imágenes, se recomienda usar lubricante a base de agua para mejorar la transmisión de las ondas sonoras (Colazo & Kastelic, 2014).

Una vez que se introduce el transductor el técnico debe avanzar cranealmente a lo largo del piso rectal, la cara del transductor debe ser presionado de manera firme contra la mucosa rectal para una mejor transmisión de las ondas, procurando mover la sonda de forma delicada y sistémica a lo largo del aparato reproductor (Medan & El-aty, 2010) y el equipo debe ser colocado en una área segura con luz tenue, donde sea fácil de ajustar y ver las imágenes (Colazo & Kastelic, 2014).

Este procedimiento ecográfico requiere un personal capacitado para efectuar de forma sistemática y metódica la interpretación eficaz de las imágenes y cierta habilidad en el manejo óptimo del equipo por parte del examinador, se ha sugerido evaluar primero los ovarios para ayudar a interpretar el examen del resto del tracto reproductivo, por lo tanto, cada ovario debe ser manipulado con suficiente destreza y debe entrar en estrecho contacto con el transductor para así desarrollar un diagnóstico más preciso (DesCoteaux et al., 2009; Menezes et al., 2011).

3.11.3 Descripción de los órganos reproductivos observados mediante ultrasonografía

La ecografía de los ovarios proporciona diferentes imágenes detalladas dependiendo de la fase de su desarrollo, poseen un tamaño de 2 - 5 cm de longitud, en esta estructura podemos encontrar folículos, cuerpo lúteo, cuerpos hemorrágicos, vasos ováricos, estroma ovárico y en algunos casos quistes siendo necesario tener una comprensión fundamental del ciclo estral bovino para aprovechar al máximo la ecografía, de hecho las estructuras más vistas son folículos y cuerpo lúteo (Jyoti et al., 2019; Whitfield, 2018).

Los folículos contienen líquido anecoico en su interior, rodeado por una pared exterior de células tecales y en su interior por una pared de células de la granulosa, es decir, son estructuras de forma esférica relativamente fáciles de identificar en la imagen ecográfica, pero no todos los folículos siempre pueden observarse esféricos debido a la presión transferida del transductor en el tejido ovárico circundante o la compresión de los folículos adyacentes y las estructuras lúteas (Jyoti et al., 2019; Lemma, 2013).

El tamaño de los folículos es importante en la evaluación ecográfica, aquellos folículos con un diámetro de 10 - 15 mm se pueden identificar con una precisión del 90% de igual forma los folículos con diámetro superior a 15 mm son identificados más fácilmente con un 100% de precisión (Jyoti et al., 2019). No obstante, para identificar folículos muy pequeños se debe utilizar un equipo de excelente calidad y resolución, así una máquina de frecuencia 7,5 MHz puede llegar a detectar folículos de aproximadamente 3 mm (Whitfield, 2018).

El cuerpo lúteo (CL) se encuentra en el ovario, este tejido lúteo aparece en la imagen ecográfica como una área claramente ecogénica, se puede observar en un examen ecográfico a los 4 días después de la ovulación hasta el día 16, cuando logra alcanzar su tamaño máximo para luego continuar con su regresión en caso de no haber preñez (IMV, 2020).

Es fácil de identificar por la apariencia y densidad del tejido blando, que se distingue claramente en el estroma ovárico, su diámetro va desde 7 a 35 mm dependiendo de la etapa del ciclo estral en que se halle la vaca al momento de realizar la ecografía, en algunos casos el CL puede tener la presencia o ausencia de una cavidad llena de líquido de color anecoico, cuando se presente líquido en dicha cavidad el cuerpo lúteo tomará la apariencia de una rosquilla y no debe confundirse con un quiste lúteo (Whitfield, 2018).

3.12 Técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA SANDWICH)

Esta prueba permite identificar un antígeno específico en una muestra, en la superficie de cada pocillo se prepara con una cantidad exacta de anticuerpo para capturar el antígeno deseado y con albúmina de suero bovino se bloquean los sitios libres de la placa. Se agrega en la placa la muestra que contiene el antígeno para luego agregar un anticuerpo primario específico para el antígeno. Luego se aplica anticuerpos secundarios ligados a enzimas que se unen al anticuerpo primario, pero aquellos conjugados (anticuerpo-enzima) no unidos se eliminan a través de un lavado. Se añade el sustrato, el mismo que se transforma enzimáticamente en un color que puede ser cuantificado (Gan & Patel, 2013).

Materiales y métodos

4.1 Materiales

Materiales biológicos

- Vacas
- Ovarios
- Sangre

Materiales físicos

- Ecógrafo (Aloka ProSound 2[®], Tokyo-Japón)
- Equipo de disección
- Balanza
- Calibrador
- Cámara
- Teléfono móvil
- Guantes Nitrilo
- Guantes ginecológicos
- Frascos estériles de 250 ml
- Recipientes plásticos
- Cooler
- Tubos vacutainer color lila
- Agujas vacutainer
- Jeringas de 5 – 20 ml
- Torundas de alcohol
- Papel secante
- Regla
- Cinta scotch
- Fundas de basura rojas y negras

Materiales químicos

- Alcohol 70%
- Kit de ELISA (Ansh Labs Bovine. USA).
- Suero fisiológico 0,09%
- Gel

Materiales de Laboratorio

- Congelador
- Vaso de precipitación
- Pipetas automáticas
- Centrifuga
- Tubos eppendorf

4.2 Métodos y técnicas empleadas

Área de estudio

Las tomas de muestras de sangre para la determinación de la concentración de AMH en las vacas fueron realizadas en el camal municipal de Cuenca (EMURPLAG), en el patio de pre-faenamiento. Los ovarios fueron recuperados en la sala de eviscerado de este centro. Finalmente, la valoración morfométrica de los ovarios y el RFA en forma visual y ecográfica se ejecutó en el anfiteatro de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Unidades experimentales

Se seleccionaron 100 vacas de raza Holstein mestiza, que llegaron a EMURPLAG, y que presentaron una condición corporal $\geq 2,5$ en la escala de 1 - 5 (Song et al., 2019). Los dos ovarios de las 100 vacas (200 ovarios) seleccionadas, fueron recuperados en sala de eviscerado, de estos se descartaron aquellos que se encontraban acíclicos, es decir, aquellos que no tenían ningún cuerpo lúteo. Al final luego de cumplir con todos los criterios de inclusión y exclusión, en total se trabajó con 80 animales.

Diseño experimental

La investigación fue descriptiva, observacional, en la cual se tomó en primera instancia en la sala de pre-faenamiento una muestra de sangre de los animales seleccionados para la determinación de la concentración de la hormona anti-mülleriana.

En un segundo momento, los ovarios de las vacas seleccionadas se recuperaron y luego se transportaron en cooler que contenía solución fisiológica a temperatura de 35 °C a la Facultad de Ciencias Agropecuarias para la evaluación del peso, tamaño del ovario y del cuerpo lúteo; así como, para realizar el RFA en forma visual y mediante ultrasonografía.

A continuación, se determinó la fase del ciclo estral en la cual se encontraba el animal al momento de su faenamiento (metaestro, diestro y proestro), para relacionar con los niveles

de AMH. Finalmente, se estableció la fase de la onda folicular (reclutamiento, selección y dominancia) y relacionó con los niveles de AMH.

Variables:

- Niveles de la hormona anti-mülleriana (AMH) pre-mortem (bajo y alto).
- Recuento de folículos antrales (RFA) post mortem (visual y mediante ecografía)
- Tamaño del ovario y cuerpo lúteo (ecografía)
- Peso y tamaño del ovario y del cuerpo lúteo (visual-directa)
- Fase del ciclo estral en la cual se encontraba el animal antes de ser faenado (proestro; metaestro y diestro)
- Fase de la onda folicular

Metodología para la investigación**Medición de las concentraciones de hormona anti-mülleriana (AMH)**

Una vez seleccionados las vacas que cumplían con los criterios de inclusión arriba determinados, estos fueron identificados con pintura. En la sala de pre-faenamiento se procedió a tomar una muestra de sangre (4 ml) de la vena coccígea en tubos vacutainer con EDTA. Las muestras fueron identificadas y colocadas en un cooler con hielo seco a 5 °C para ser trasladadas hasta el laboratorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. En el laboratorio las muestras fueron centrifugadas durante 20 minutos a 3.000 gravedades x 15 minutos y el sobrenadante (plasma) se recuperó y almacenó en tubos Eppendorf a – 20 °C hasta su posterior análisis.

La concentración plasmática de AMH fue determinada con el kit de Elisa Ansh Labs Bovine (USA), en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. El kit de acuerdo a las indicaciones del fabricante realiza una detección colorimétrica por absorbancia de longitud de onda dual a 450 nm y 630 nm como filtro de referencia. Con un rango de determinación de 6,13 - 2240 pg/ml, límite de detección 11 pg/ml; tamaño de la muestra 50 µL; tipo de muestra (plasma).

Recolección de los ovarios post mortem

Los ovarios fueron recuperados de la sala de evisceración del camal municipal de Cuenca EMURPLAG. Estos fueron colocados en dos frascos previamente rotulados (ovario izquierdo y ovario derecho), los cuales contenían solución fisiológica a temperatura de 35 °

C. Finalizada la recolección, los frascos con las muestras se colocaron en un cooler y se transportaron al laboratorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias para su respectiva evaluación en un tiempo no mayor a 4 horas.

Una vez en el laboratorio con una tijera retiro los tejidos anexos a los ovarios, seguidamente se lavaron individualmente los ovarios con solución fisiológica a 35 °C, hasta eliminar todas las impurezas.

Evaluación del tamaño, peso del ovario y cuerpo lúteo mediante ultrasonografía

Los dos ovarios derecho e izquierdo de cada bovino por separado fueron evaluados mediante un ecógrafo portátil con una sonda lineal con una frecuencia de 7,5 MHz. Se midió el ancho y largo del ovario y se determinó un valor promedio expresado en milímetros (mm). Esta actividad fue realizada por el mismo técnico siempre.

El cuerpo lúteo (CL) también fue evaluado de idéntica manera mediante ecografía, realizando dos mediciones ancho y largo y su promedio fue considerado su tamaño (mm).

Evaluación de los folículos antrales mediante ultrasonografía

El recuento de folículos antrales en el ovario se realizó mediante ecografía, con un equipo provisto de un transductor lineal 7,5 MHz, para lo cual se utilizó la técnica de barrido en ubicación, cráneo – caudal y latero – medial, empezando por el ovario derecho y luego el ovario izquierdo de acuerdo a la técnica descrita por (Ayala et al., 2017).

Cada folículo identificado fue medido su ancho y largo y el promedio se consideró el tamaño del mismo, estos folículos se clasificaron en los siguientes grupos: G1= ≤ 3 mm; G2= 3 - 5 mm; G3= >5 y 10 mm; G4= >10 mm.

Evaluación del tamaño, peso del ovario y cuerpo lúteo en forma directa

Los dos ovarios derecho e izquierdo de cada bovino en estudio fueron pesados por separado mediante una balanza de precisión y su resultado se expresará en gramos (g). Luego, con la ayuda de un calibrador se midió el largo y ancho del ovario y este valor se dividió para, para obtener el tamaño del cada ovario (mm).

Para la valoración del cuerpo lúteo (CL) se realizó la enucleación del CL, luego se procedió a pesar el CL en la balanza de precisión (g) y con el calibrador se tomó la medida y el resultado fue expresado en milímetros (mm).

Evaluación de los folículos antrales mediante conteo visual

Cada ovario para su análisis fue colocado en una placa Petri, para ser observado de forma sistemática todo el ovario e ir contando y midiendo (mm) cada folículo antral existente con la ayuda de una regla. Los folículos identificados y medidos fueron clasificados en los siguientes grupos: G1= <3 mm; G2= 3 – 5 mm; G3= >5 y <10 mm; G4= >10 mm.

Determinación de la fase del ciclo estral de las vacas muestreadas

Para determinar la fase del ciclo estral (metaestro, diestro, proestro) en la cual se encontraban los animales al momento de su faenamiento. Para esto se consideró los parámetros establecidos para el tamaño del cuerpo lúteo (CL) tomando como referencia el trabajo de (Ayala et al., 2019) en vaquillas Holstein, Brown Swiss y Criollas en combinación con el color del CL (hemorrágico, blanco y amarillo) de acuerdo a lo descrito por (Hernández, 2016).

En cuanto para la fase de la onda folicular se evaluó el número y tamaño de cada folículo presente en los ovarios, de acuerdo a lo mencionado por (Ginther, 2016), se tomó en cuenta a las 80 vacas en estudio, misma que se distribuyeron en tres grupos: Reclutamiento (n=30); Selección (n=17) y Dominancia (n=33).

Análisis estadístico

La sistematización de los datos obtenidos se realizó a través del Programa Microsoft Excel y el análisis estadístico mediante el programa SPSS versión 25®. Se determinó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro Wilks. Se establecieron estadígrafos principales para el tamaño, peso tanto del ovario y cuerpo lúteo, así como para los niveles de hormona anti-mülleriana. Se organizaron los datos de las 80 vacas basándonos en el recuento de folículos antrales (RFA) en grupos con alto, medio y bajo RFA, esto en base a terciles. A continuación, se determinó la concentración media, error estándar de AMH, peso y tamaño del ovario y del cuerpo lúteo, en los grupos de alto, medio y bajo RFA mediante ANOVA. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey al 5%. Además, se determinará correlación entre variables mediante Pearson.

Resultados y Discusión

5.1 Resultados generales de los niveles de AMH y el RFA

Luego del análisis de las muestras de sangre tomadas pre-mortem a las 80 vacas seleccionadas, se determinó una concentración de AMH de $280,1 \pm 15,53$ pg/mL, con un rango entre 53,7 y 580,1 pg/mL. La media de folículos observados en forma visual fue $26,9 \pm 9,49$ (RFA) con un rango que oscila entre 6 – 53 folículos y al utilizar la técnica ecográfica se estableció $20,5 \pm 7,53$ folículos como media, con valores entre 5 – 37 folículos.

Además, se observó una correlación alta y positiva ($r=0,85$; $p<0,001$) entre la concentración de la AMH y el RFA realizado mediante la técnica visual, siendo posible explicar el 72% de los casos mediante la regresión lineal establecida. Al utilizar la técnica ecográfica para el RFA la correlación con la AMH fue de $r= 0,81$; $p<0,001$ con un $R^2= 0,83$ (Tabla 1).

Tabla 1. Media y desviación estándar general de la concentración de hormona anti-mülleriana (AMH), y el recuento de folículos antrales (RFA) realizado mediante dos técnicas (Visual y Ecográfica).

Variable	N	X	E	Valores		R	R ²
				Mínimo	Máximo		
AMH	80	280,1	5,53	53,7	580,1		
RFA Visual	80	26,9*	9,49	6	53	0,85	0,72
RFA Ecográfica	80	20,5*	7,53	5	37	0,81	0,83

AMH=Hormona anti-mülleriana. RFA Visual=recuento de folículos antrales mediante la técnica visual. RFA Ecográfica=recuento de folículos antrales mediante la técnica ecográfica. R=correlación de Pearson. R²= regresión lineal simple. *=diferencia estadística entre técnicas ($p < 0,05$).

La media del RFA obtenido en este trabajo mediante la técnica ecográfica está en concordancia con los valores reportados por Mossa et al., (2012), quienes encontraron un promedio de $18,5 \pm 9,0$ folículos en vacas Holstein valoradas en Irlanda en diferentes temporadas del año, en un sistema de alimentación al pastoreo. Estos resultados nos permiten corroborar que animales de un determinado genotipo (Holstein), bajo condiciones similares de alimentación (pastoreo), presentaron concentraciones promedio análogas de AMH.

Sin embargo, cuando se evaluó el genotipo Holstein, bajo sistemas de alimentación intensivo basado en el uso de ración totalmente mezclada, en el trópico bajo, se estableció una media de 23 ± 1 folículos, rango: 6 - 45 folículos (Gobikrushanth et al., 2017). Asimismo, en el trabajo de Furukawa et al., (2020), describieron una media de $27,2 \pm 12,2$ folículos, rango entre 3,4 y 52,0 folículos, en condiciones ambientales tropicales húmedas.

La concentración media de AMH determinada en el presente trabajo está en concordancia con estudios previos descritos para ganado de genotipo Holstein, estos investigadores usaron el mismo Kit de Elisa (Ansh Labs Bovine. USA) empleado en esta investigación, obteniendo una concentración media de 264 pg/mL; $218,7 \pm 14,5$ pg/mL y 257 pg/mL respectivamente (Ribeiro et al., 2014; Gobikrushanth et al., 2017; Gobikrushanth et al., 2019). A pesar de usar el mismo kit de Elisa Gobikrushanth et al., (2018), establecen valores medios de AMH inferiores a los encontrados en nuestro trabajo ($191,1 \pm 6,3$ pg/mL), con valores mínimos de 13,9 pg/mL y máximos de 1.879 pg/mL, la diferencia en los valores medios de AMH entre estos dos trabajos podría ser explicado: en primera instancia por el momento en el cual se extrajo la muestra sanguínea de las vacas lactantes, mismas que se encontraban entre los días $7 \pm 2,4$ días posparto de las cuales un 32,9 % eran vacas primíparas, pues Ribeiro et al., (2014), informo que la concentración de AMH es mayor en las vacas de segunda y tercera lactancia en comparación con las de primera y cuarta lactancia. En contraposición, en nuestro estudio las muestras sanguíneas fueron tomadas en la sala de pre-faenamiento, se desconocía el número de lactancia y el momento del ciclo estral en el cual se hallaba cada vaca.

Existen otros trabajos que utilizan diferentes kits de Elisa para determinar la concentración de AMH así como Rico et al., (2009) estos investigadores midieron a través del active MIS/AMH ELISA kit (DSL, Cergy – Pontoise, Francia) en vacas de raza Holstein estableciendo valores inferiores a nuestro trabajo, un mínimo de 25 pg/mL y un valor máximo 228 pg/mL bajo condiciones de manejo y medioambientales diferentes a las del presente estudio.

La correlación establecida en este trabajo entre el RFA y la concentración de AMH al utilizar la técnica ecográfica para realizar el RFA es similar a la obtenida al utilizar la técnica visual, y estos valores son similares al reportado por Rico et al., (2009), quienes llegaron a establecer una correlación entre el RFA y AMH de $r=0,79$; $p<0,001$, a pesar de que el promedio de la AMH es inferior al determinado en nuestro ensayo (Tabla 1). Del mismo modo, Ireland et al., (2008), mencionó una correlación positivamente ($r=0,90$) con el conteo

ecográfico de folículos antrales y el número total de folículos determinados histológicamente en los ovarios de bovinos jóvenes.

Finalmente, autores como Guerreiro et al., (2014), describen la existencia de una asociación entre el RFA y la AMH ($R^2=0,61$; $p<0.001$) y, por lo tanto, la cantidad de folículos antrales podrían ser explicados en un 61% por la concentración de AMH. Esta asociación guarda concordancia con lo determinado en el presente estudio ($R^2= 0,72$; $p<0,001$; técnica visual y $R^2= 0,83$; $p<0,001$ técnica ecográfica; Figura 1). Por lo tanto, y a pesar de la diferencia en el valor máximo de la AMH la relación y la asociación entre el RFA y los niveles de AMH mantienen similitud en los diferentes trabajos analizados, lo que nos permite considerar que se puede considerar la AMH como un marcador endocrino de la cantidad de folículos antrales.

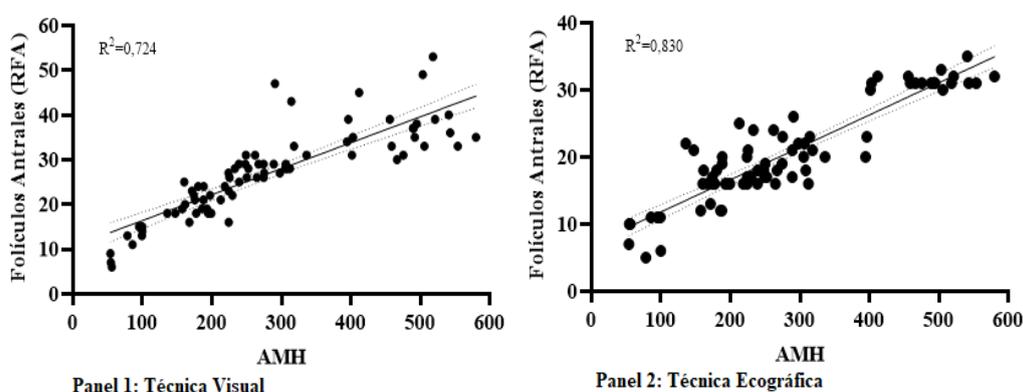


Figura 1. Grafica de regresión lineal del recuento de folículos antrales (RFA) y la concentración de la hormona anti-mülleriana (AMH). Panel 1: RFA mediante técnica visual. Panel 2: RFA mediante la técnica ecográfica.

5.2 Resultados de la concentración de AMH y el RFA organizados en grupos de alto, medio y bajo recuento de folículos antrales determinados por la técnica visual y ecográfica

Mediante técnica visual (Fig. 2, Panel 1) se realizó el recuento de folículos antrales (RFA) y se organizó en grupo con Alto ($36,9 \pm 1,16$), grupo Medio ($23,8 \pm 0,62$) y Bajo ($11,4 \pm 1,13$) RFA, con diferencia estadística entre grupos ($p<0,05$). Igual comportamiento fue observado al realizar el recuento de folículos utilizando la técnica ecográfica (Fig. 2, Panel 2) grupo Alto ($31,4 \pm 0,26$ folículos), Medio ($19,0 \pm 0,41$ folículos) y Bajo ($10,1 \pm 0,69$).

De los resultados obtenidos se puede establecer que las dos técnicas (visual o ecográfica) puede ser utilizadas para realizar el RFA, pues generan resultados similares en grupos de

bajo y medio RFA; sin embargo, debemos tener cuidado con animales de alto RFA, ya que la ecografía puede proporcionar un 9,76% menos de recuento de folículos en animales con alto número de estos.

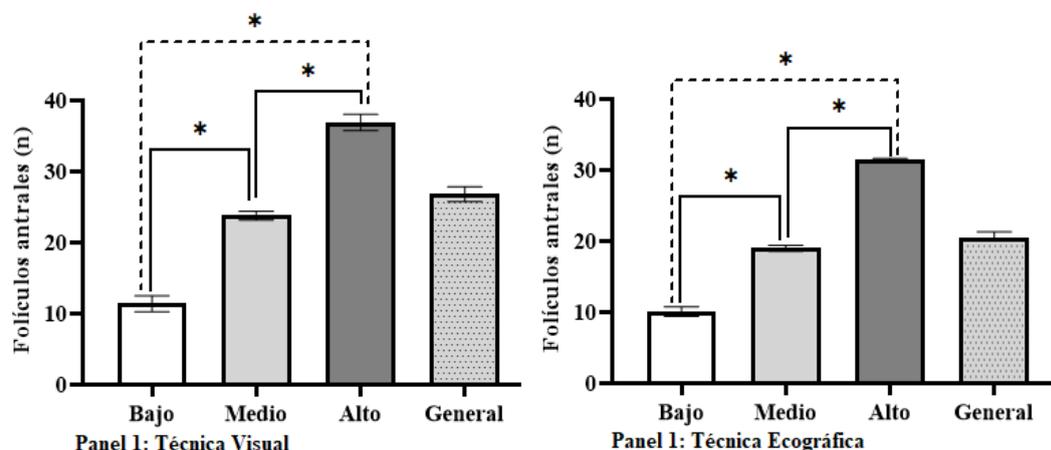


Figura 2. Media y error estándar del recuento de folículos antrales (RFA) en grupos de Bajo (≤ 15 folículos), medio (entre 16-29 folículos) y alto (> 29 folículos). Panel 1= valoración por técnica visual. Panel 2= valoración por técnica ecográfica* = diferencia estadística entre grupos. Prueba de Tukey al 5%.

Sin embargo, los resultados del conteo ecográfico de folículos antrales de esta investigación son similares a los descritos por Batista et al., (2014), en vaquillas Holstein, en sistema de estabulación completa, alimentadas con ración controlada (TMR), en Sao Paulo (Brasil) con un RFA promedio de $13,4 \pm 1,40$ folículos (baja), $34,3 \pm 3,12$ folículos (alta).

Otros trabajos realizados en Holstein como el de Burns et al., (2005) quienes aplicaron un protocolo de sincronización de celo a cada animal y luego realizaron ecografía en la mañana y tarde para evaluar el número de folículos durante las diferentes ondas folicular en un mismo ciclo estral obteniendo un grupo muy alto (25 folículos); alto (21–25 folículos); intermedio (16-20 folículos) y bajo (15). Del mismo modo, encontramos resultados similares descritos por Nagai et al., (2015) quien evaluó ecográficamente los folículos antrales de 16 vacas Holstein sometidas a un protocolo de OPU, clasificando en dos grupos; Alto ($26,1 \pm 6,1$) y Bajo ($16,9 \pm 5,4$), estos dos trabajos coinciden con lo descrito por (Ireland et al., 2011) donde se estableció una clasificación de los folículos antrales en tres grupos alto, medio y bajo cuyos valores fueron de 25; 16 - 24 y 15 folículos respectivamente.

5.3 Niveles de la hormona anti-mülleriana en grupos de alto, medio y bajo RFA

Los niveles de hormona anti-mülleriana (pg/mL) en los grupos clasificados como alto, medio y bajo recuento de folículos antrales mediante la técnica visual (Fig. 3, Panel 1), demostraron valores de $439,5 \pm 17,98$ pg/mL; $223,3 \pm 7,48$ pg/mL; $80,2 \pm 6,82$ pg/mL respectivamente con diferencia entre grupos ($p < 0,05$). Sin embargo, cuando los grupos fueron clasificados utilizando la técnica ecográfica (Fig. 3, Panel 2) se establecieron valores de $489,8 \pm 11,36$ pg/mL (alto); $243,9 \pm 8,74$ pg/mL (medio); $109,5 \pm 13,66$ pg/mL (bajo) igual con diferencia entre grupos ($p < 0,05$).

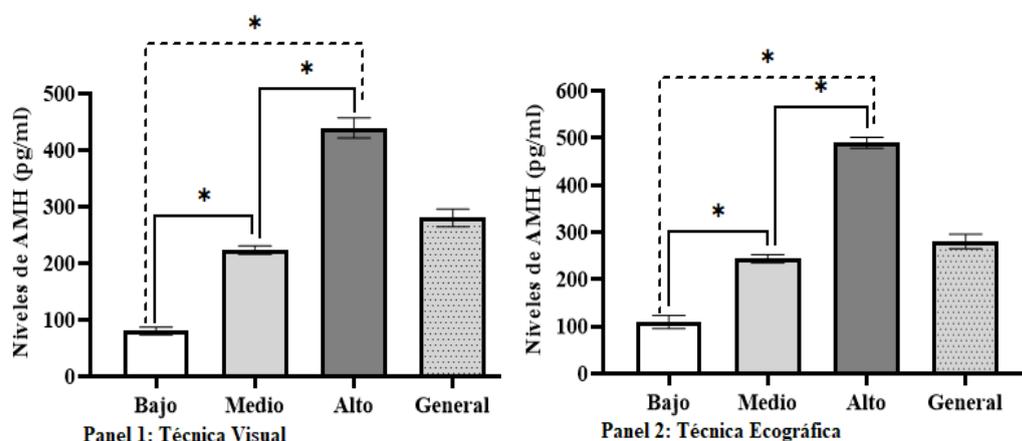


Figura 3. Niveles de hormona anti-mülleriana en los grupos de Bajo recuento de folículos antrales (≤ 15 folículos=), medio (entre 16-29 folículos) y alto (> 29 folículos). Panel 1: recuento de folículos antrales por técnica visual. Panel 2= recuento de folículos antrales por técnica ecográfica*=diferencia estadística entre grupos. Prueba de Tukey al 5%.

Los valores de AMH determinado en el presente trabajo son similares a los reportados por Succu et al., (2020) quienes establecieron concentraciones de $115,08 \pm 6,37$ pg/mL; $398,24 \pm 9,74$ pg/mL y $1195,8 \pm 65,8$ pg/mL de AMH en ganado lechero en Sardinia, Italia. Datos que concuerda con lo enunciado por Ribeiro et al., (2014) quienes valoraron 60 vacas al día 7 y 15 del ciclo estral obteniendo 85 pg/mL en el grupo bajo, 263 pg/mL en el grupo medio y 631 pg/mL para el grupo alto. De igual manera, Center et al., (2018) reportaron concentraciones de AMH en grupos Q1= bajo; Q2= medio Q3= alto y Q4= muy alto (13 - 168 pg/mL, 169 - 263 pg/mL, 264 - 363 pg/mL, 364 - 898 pg/mL respectivamente).

Otros resultados concordantes fueron descritos, por Souza et al., (2014) quienes establecieron niveles de hormona anti-mülleriana en 72 vacas lactantes de la raza Holstein, clasificando en Q1 (grupo de bajo AMH; 0,01 a 82,6 pg/mL); medio Q2= 91,1 a 132,5 pg/mL; alto Q3=135,3 a 183,8 pg/mL; muy alto Q4= 184,4 a 374,3 pg/mL.

Sin embargo, hay trabajos como el de Rico et al., (2011) quienes establecieron valores al estudiar vacas primíparas de raza Holstein sometidas a una prueba de estimulación ovárica y clasificados en grupos de alta y baja respuesta ovulatoria estableciendo concentraciones de AMH $94,86 \pm 11,2$ pg/ml y $40,7 \pm 14,8$ pg/mL respectivamente.

5.4 Tamaño y peso del ovario determinado por la técnica visual y ecográfica en los grupos de bajo, medio y alto nivel de concentración de AMH

El tamaño promedio del ovario izquierdo (OI) y derecho (OD) determinado a través de la técnica visual fue similar ($p > 0,05$) entre grupos. Iguales condiciones de tamaño fueron observadas en los dos ovarios al ser valorados mediante la técnica ecográfica (Tabla 2). En lo que respecta al peso, los dos ovarios mostraron valores semejantes sin diferencia estadística en los tres grupos en estudio (Tabla 2).

Tabla 2. Media y desviación estándar del tamaño del ovario derecho e izquierdo determinado por las técnicas visual y ecográfica; además, peso del ovario derecho e izquierdo establecido por la técnica visual, en los grupos clasificados como de bajo, medio y alto nivel de hormona anti-mülleriana (AMH).

	Visual		Ecografía		P
	OD	OI	OD	OI	
Tamaño del ovario (mm)					
Bajo nivel AMH	29,0±3,84	30,8±2,59	28,1±4,69	28,5±5,68	ns
Medio nivel AMH	28,5±5,04	30,2±5,78	28,9±4,75	29,7±4,73	ns
Alto nivel AMH	30,0±4,22	29,6±4,73	29,6±3,00	28,3±4,99	ns
Peso del ovario (g)					
Bajo nivel AMH	8,7±3,81	7,5±4,02			ns
Medio nivel AMH	7,7±3,76	8,5±3,03			ns
Alto nivel AMH	8,6±2,61	8,3±4,05			ns

OD=ovario derecho; OI=ovario izquierdo. Bajo=grupo con bajo nivel de AMH (<100 pg/mL). Medio= (entre 100-312 pg/mL). Alto= (>312 pg/mL). ns= sin significancia estadística. Prueba de Tukey al 5%.

Los resultados del tamaño de los ovarios OI y OD establecidos en el presente trabajo por la técnica visual y ecográfica son mayores a los descritos por Loor et al., (2021) en vacas Holstein mestizas, quienes describen un diámetro de ($23,4 \pm 0,38$ mm; OD) y OI ($21,4 \pm$

0,35 mm) ecográficamente y al utilizar la técnica directa visual reportaron un diámetro medio de $22,9 \pm 0,42$ mm; OD y $20,96 \pm 0,33$ mm; OI respectivamente.

El peso del ovario OD y OI establecidos en forma visual en el presente estudio fueron inferiores a los determinados por Morris et al., (1993) ellos reportaron 13,6 gramos (OD) y 11,4 gramos (OI) en ganado Holstein mestizo, estos resultados explican que el OD tiene un mayor peso que el OI; sin embargo, en nuestra investigación los dos ovarios tienen pesos similares.

5.5 Tamaño y peso del cuerpo lúteo determinado por la técnica visual y ecográfica en los grupos de bajo, medio y alto nivel de concentración de AMH

Los tamaños promedios del cuerpo lúteo determinado por la técnica visual en los tres grupos en estudio fueron similares ($p > 0,05$). Iguales características de tamaño de CL fueron observados al utilizar la técnica ecográfica. Además, se estableció a través de la técnica visual que el peso del ovario en los tres grupos se encontraba alrededor de los 4 gramos (Tabla 3).

Tabla 3. Media y desviación estándar del tamaño (mm) del cuerpo lúteo determinado por las técnicas visual y ecográfica; además, peso (g) del cuerpo lúteo establecido por la técnica visual, en los grupos clasificados como de bajo, medio y alto nivel de hormona anti-mülleriana (AMH).

	Visual	Ecografía	P
Tamaño del cuerpo lúteo (CL)			
Bajo nivel AMH	19,9±4,26	21,6±1,79	ns
Medio nivel AMH	18,6±4,23	19,5±3,97	ns
Alto nivel AMH	18,6±3,94	19,9±4,09	ns
Peso del cuerpo lúteo (CL)			
Bajo nivel AMH	4,6±2,01		Ns
Medio nivel AMH	4,0±1,71		Ns
Alto nivel AMH	4,1±1,63		Ns

Visual=Técnica utilizada para valorar el RFA. Ecográfica=Técnica utilizada para valorar el RFA. Bajo=grupo con bajo nivel de AMH (<100 pg/mL). Medio= (entre 100-312 pg/mL). Alto= (>312 pg/mL). P=significancia estadística. Prueba de Tukey al 5%.

Si bien, Hanzen et al., (2000) en su revisión bibliográfica relata que el diámetro de un cuerpo lúteo maduro oscila entre 19 – 35 mm y un peso de 2,17 a 8,86 gramos, desde ese punto de vista, los hallazgos hechos en el presente trabajo son similares, pero son mayores

a los resultados descritos por Loor (2020), quienes mencionan que el tamaño del cuerpo lúteo evaluado mediante ecografía fue de $15,3 \pm 0,42$ mm y a través de la técnica visual directa fue $14,8 \pm 9,44$ mm.

5.6 Número de folículos antrales determinados mediante la técnica visual y ecográfica y agrupados en <3 mm; 3-5 mm; 5-10 mm; > 10 mm

El recuento de folículos antrales (RFA) <3 mm observados mediante la técnica visual y ecográfica en el grupo de bajo nivel de AMH fue similar ($p > 0,05$). Igual comportamiento se observó en el grupo denominado medio; sin embargo, en el grupo de alto nivel de AMH se estableció mediante la técnica ecográfica un menor RFA ($20,6 \pm 6,10$) vs el determinado observado mediante la técnica visual ($27, 7 \pm 5,59$), con diferencia estadística entre estos grupos. Esta similitud de resultados en cuanto al RFA al utilizar la técnica ecográfica y visual se repite en los folículos entre 3 – 5 mm (Tabla 4).

Al evaluar los folículos entre 5 – 10 mm, se concluye que da igual usar la técnica visual o ecográfica en los grupos de bajo y alto nivel de AMH, sin embargo, en el grupo clasificado con un nivel medio de AMH comparten características tanto del grupo de bajo como el de alto nivel de AMH. Finalmente, el RFA > 10 mm puede ser realizado con el mismo nivel de confianza tanto con la técnica ecográfica como visual.

Tabla 4. Media y desviación estándar del número de folículos antrales <3 mm; entre 3-5 mm; entre 5-10 mm y >10 mm, observados por las técnicas visual y ecográfica, en los grupos clasificados como de bajo, medio y alto nivel de hormona anti-mülleriana (AMH).

	Visual			Ecografía		
	Bajo	Medio	Alto	Bajo	Medio	Alto
<3mm	8,4±3,64 ^a	16,8±4,21bc	27,7±5,59d	6,2±2,24 ^a	12,9±3,52b	20,6±6,10c
3-5mm	1,8±1,30 ^a	5,3±3,90bc	6,8±4,08bc	1,8±1,07 ^a	4,0±1,90ab	7,4±4,14c
5-10mm	0,3±0,70 ^a	1,1±1,14ab	1,8±1,72b	1,6±1,43ab	1,7±1,44b	1,7±1,56b
>10mm	0,9±0,60 ^a	0,6±0,68 ^a	0,5±0,50 ^a	0,8±0,55 ^a	0,6±0,53a	0,6±0,59a
Total	11,4±3,39a	23,8±4,14c	36,9±6,00e	10,1±2,49 ^a	19,0±2,84b	31,4±1,12d

Visual=Técnica utilizada para valorar el RFA. Ecográfica=Técnica utilizada para valorar el RFA. Bajo=grupo con bajo nivel de AMH (<100 pg/mL). Medio= (entre 100 - 312 pg/mL). Alto= (>312 pg/mL). P=significancia estadística. Prueba de Tukey al 5%.

5.7 Folículos antrales y el nivel de hormona antimülleriana en las diferentes fases del ciclo estral

Al evaluar el número de folículos antrales en las diferentes fases del ciclo estral (proestro = $32 \pm 2,45$; metaestro = $25,2 \pm 1,83$; diestro = $25,7 \pm 1,36$), se determinó que en el proestro hay mayor número de folículos antrales en comparación con las fases de metaestro y diestro ($p < 0,05$; Fig. 4; Panel 1).

Sin embargo, los niveles de AMH (pg/mL) establecidos en el diestro ($336,5 \pm 33,23$ pg/mL), metaestro ($256,3 \pm 30,58$ pg/mL) y proestro ($268 \pm 20,43$ pg/mL), son similares sin diferencia entre fases del ciclo estral (Fig. 4; Panel 2).

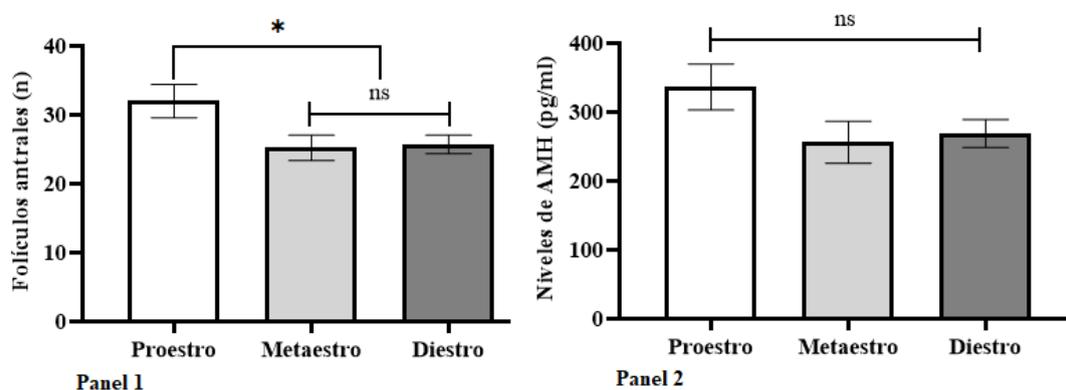


Figura 4. Media y error estándar Panel 1: de folículos antrales observados en el proestro, metaestro y diestro. Panel 2: nivel de hormona anti-mülleriana en la fase proestro, metaestro y diestro. *=diferencia estadística entre grupos. Prueba de Tukey al 5%.

El mayor número de folículos antrales observados en fase de proestro es debido a que dentro de esta fase se incluyeron los ovarios de animales que se encontraban en la fase de estro, esta metodología fue necesaria utilizar ya que es muy difícil separar el proestro del estro considerando al tamaño del CL, su color, así como la presencia del folículo de mayor tamaño.

En lo que respecta a los valores de los niveles de AMH determinados en nuestro estudio en las tres fases (proestro, metaestro y diestro) como ya se indicó, fueron similares entre fases, resultados que son concordantes con los descritos por Souza et al., (2014) quienes establecieron valores de AMH en la fase de proestro = $132,7 \pm 9,7$ pg/mL y diestro = $150,9 \pm 10,6$ pg/mL en vacas Holstein sin diferencia entre fases ($p=0,57$). Esto corrobora la teoría que los niveles de AMH son estables durante el ciclo estral de los bovinos, como lo

determinaron en sus trabajos en ganado de carne Ireland et al., (2011) en ganado lechero (Rico et al., 2009).

5.8 Foliculos antrales y el nivel de hormona antimülleriana en las fases de la onda

Al organizar el RFA de acuerdo a la fase de la onda folicular se determinó que en reclutamiento llegaron a observarse $31 \pm 1,6$ folículos, en la fase de selección $26,3 \pm 2,13$ folículos y en dominancia $23,4 \pm 1,59$ folículos (Fig. 5; Panel 1).

Los niveles de AMH (pg/mL) en reclutamiento ($335,2 \pm 23,79$ pg/mL) son mayores a los obtenidos en la fase de selección ($273,9 \pm 32,91$ pg/mL) y dominancia ($233,3 \pm 23,29$ pg/mL), como se puede observar en la figura 5, panel 2.

Estos resultados corroboran los enunciados de la hormona anti-mülleriana es producida por las células de la granulosa de los folículos antrales pequeños sanos (Ireland et al., 2008), considerando que cuando la expresión de AMH disminuye, el folículo se vuelve más sensible a la FSH y puede ser reclutado para ingresar al grupo de folículos que pueden volverse dominantes (Visser & Themmen, 2014).

Esta observación está respaldada por el hecho de que la expresión de AMH depende del desarrollo folicular (Rico et al. 2011), ya que las concentraciones más altas se detectaron en células de la granulosa de folículos antrales pequeños y preantrales grandes sanos (Monniaux et al., 2013). Dado el papel propuesto de la AMH en la modulación de la sensibilidad a la FSH en la granulosa.

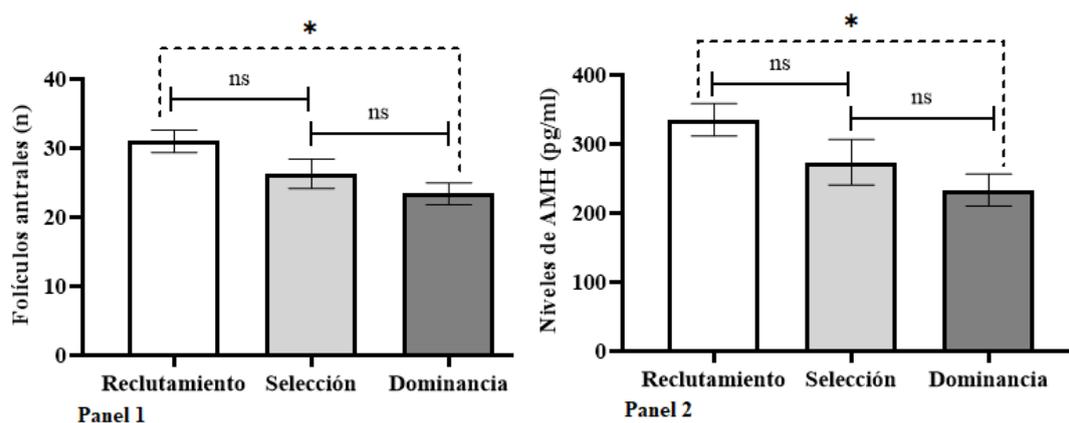


Figura 5. Media y error estándar Panel 1: de folículos antrales observados en la fase de reclutamiento, selección y dominancia. Panel 2: nivel de hormona anti-mülleriana en la fase de reclutamiento, selección y dominancia. *=diferencia estadística entre grupos. Prueba de Tukey al 5%.

Además, existe evidencia científica que indica que Los niveles de transcripción de AMH fueron similares en las células de la granulosa de los folículos más grandes (F1) y segundo folículo más grande (F2) antes de la desviación folicular; sin embargo, luego de esta fase los niveles de transcritores de AMH son menores en el folículo dominante y subordinados (Ilha et al., 2016), lo cual coincide con nuestros resultados en donde en la fase de reclutamiento y selección (es decir antes de la desviación) los niveles de AMH son similares; sin embargo, cuando pasan a la fase de dominancia los niveles de AMH son menores a las dos fases anteriores.

Conclusiones

- La concentración de la hormona anti-mülleriana determinada para vacas Holstein mestizas mediante muestreo sanguíneo pre-mortem, presentan valores dentro de los establecidos a nivel internacional.
- La correlación entre la concentración de AMH (establecido pre-mortem) y el RFA determinado mediante las técnicas visual y ecográfica en ovarios recuperados de la sala de post-faenamiento reafirman lo establecido en estudios previos para esta especie.
- Las características morfométricas del ovario y cuerpo lúteo no se ven influenciadas por la concentración de AMH ni por el RFA.
- El recuento de folículos antrales <3 mm se ve afectado por la técnica utilizada (visual o ecográfica) para establecer el número total de estos cuando se trata de animales clasificados como de alta población folicular; sin embargo, si son animales de bajo o medio RFA da igual utilizar cualquiera de las dos técnicas.
- La concentración de la AMH es estable durante las fases de ciclo estral (proestro, metaestro y diestro); sin embargo, en las fases de la onda folicular denominada reclutamiento y selección existen niveles mayores a los observados en la fase de dominancia.

Recomendaciones

- Considerando el gran valor que posee la hormona anti-mülleriana sería beneficioso continuar realizando estudios que profundicen el conocimiento de la relación de la AMH y el RFA en bovinos, lo cual permitirá realizar la selección de vacas donadoras de alto valor genético y que tengan una mejor respuesta a la superovulación dentro de los programas de mejoramiento genético
- Con un fin investigativo sería interesante iniciar un programa de selección de vacas con alta población folicular basándose en la concentración de hormona anti-mülleriana pues dicha hormona es un indicador confiable de la capacidad reproductiva que posee una vaca.

Referencias

- Aerts, J., & Bols, P. (2010). Ovarian follicular dynamics. A review with Emphasis on the bovine species. Part II: antral development, exogenous influence and future prospects. *Reproduction in Domestic Animals*, *45*, 180–187. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01298.x>
- Almeida, F., Costermans, N., Soede, N., Bunschoten, A., Keijer, J., Kemp, B., & Teerds, K. (2018). Presence of anti-müllerian hormone (AMH) during follicular development in the porcine ovary. *PLoS ONE*, *13*, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197894>
- Alward, K. J., & Bohlen, J. F. (2020). Overview of Anti-Müllerian hormone (AMH) and association with fertility in female cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, *55*, 3–10. <https://doi.org/10.1111/rda.13583>
- Araújo Soares, P., & Santos Junqueira, F. (2007). Particularidades reprodutivas da fêmea bovina: Revisão. *PubVet*, *13*, 1–6. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n02a257.1-6>
- Araújo, V., Gastal, M., Figueiredo, J., & Gastal, E. (2014). In vitro culture of bovine preantral follicles : a review. *BioMed Central*, *12*, 1–14.
- Aréchiga, C., Cortés, Z., Hernández, P., Flores, G., Rochín, F., & Ruiz, E. (2019). Review: Function and regression of the corpus luteum during the estrous cycle. *Abanico Veterinario*, *9*(1), 1–21. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21929/abavet2019.924>
- Atuesta, J. E., & Gonella, A. M. (2011). Control hormonal del ciclo estral en bovinos y ovinos Hormonal control of the estrous cycle in cattle and sheep. *Revista Spei Domus*, *7*(14), 15–25.
- Ayala, L. E., Pesantez, J., Rodas, E. R., Dután, J. B., Calle, G. R., Murillo, Y. A., Samaniego, J. X. (2019). Dinámica folicular de vaquillas Criollas al pastoreo en el altiplano ecuatoriano. *Archivos de Zootecnia*, *68*(262), 184–190.
- Ayala, L., Luis, J., Pacheco, P., Ramiro, E., Carpio, R., Silvana, M., Pesántez, R. (2017). Tamaño del folículo ovulatorio , cuerpo lúteo y progesterona sanguínea en vaquillas receptoras de embriones de tres razas en pastoreo en Ecuador. *Producción Animal*, *29*(2), 65–72.
- Bagley, J., Richter, M., & Lane, T. (2023). The role of transrectal sonography in pregnancy

- diagnosis in cattle. *Journal of Diagnostic Medical Sonography*, 39(1), 50–60.
<https://doi.org/10.1177/87564793221120260>
- Batista, E., Macedo, G., Sala, R., Ortolan, M., Sá Filho, M., Valle, T., ... Baruselli, P. (2014). Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in bos indicus (nelore) and bos taurus (holstein) heifers. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(3), 448–452. <https://doi.org/10.1111/rda.12304>
- Bearden, J., & Fuquay, J. (1982). *Reproducción animal aplicada* (1a ed). México.
- Bézar, J., Vigier, B., Tran, D., Mauléon, P., & Josso, N. (1987). Immunocytochemical study of anti-mullerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post-natal development. *Journal of Reproduction & Fertility*, 80, 509–516.
- Blon, L., & Buczinsk, S. (2009). Basis of ultrasound imaging and the main artifacts in bovine medicine. *Vet Clin Food Anim*, 25, 553–565.
<https://doi.org/doi:10.1016/j.cvfa.2009.07.002>
- Bó, G. A., Carballo Guerrero, D., Tríbulo, A., Tríbulo, H., Tríbulo, R., Rogan, D., & Mapletoft, R. J. (2010). Nuevos enfoques de la superovulación en la vaca. 22, 106–112.
- Bó, G. A., Vera Cedeño, A., Barajas Merchán, J. L., Tríbulo, A., & Mapletoft, R. J. (2018). Advances in synchronization and superovulation protocols from donor bovine embryo. *SPERMOVA*, 8(2), 147–156. <https://doi.org/DOI.10.18548/aspect/0006.14>
- Boer, H. M., Roblitz, S., Stotzel, C., Veerkamp, R., Kemp, B., & Woelders, H. (2011). Mechanisms regulating follicle wave patterns in the bovine estrous cycle investigated with a mathematical model. *Journal of Dairy Science*, 94(12), 5987–6000.
<https://doi.org/10.3168/jds.2011-4400>
- Brito Capallejas, R. (2009). *Fisiología de la reproducción animal: con elementos de biotecnología* (2nd ed.; E. F. Varela, Ed.). La Habana, Cuba.
- 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 individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biology of Reproduction*, 73, 54–62.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036277>
- Center, K., Dixon, D., Looney, C., & Rorie, R. (2018). *Anti-Mullerian hormone and follicle counts as predictors of superovulatory response and embryo production in beef*

cattle.Advances in Reproductive Sciences, 6, 22–33.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4236/arsci.2018.61003>

Colazo, M. G., & Kastelic, J. P. (2014). Aspectos básicos y aplicados del uso de la ultrasonografía en el manejo reproductivo del ganado bovino.
<https://doi.org/10.13140/2.1.2008.9288>

Cushman, R. A., Allan, M. F., Kuehn, L. A., Snelling, W. M., Cupp, A. S., & Freetly, H. C. (2009). Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *Animal Reproduction Science*, 87, 1971–1980. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1728>

Dejarnette, M., & Nebel, R. (2022). Anatomía y fisiología de la reproducción bovina.

DesCoteaux, L., Gnemmi, G., & Colloton, J. (2009). Ultrasonography of the bovine female Genital Tract. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 25 (3), 733–752.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.07.009>

Díez Bru, N. (1992). Principios básicos de la ecografía. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*, 12(3), 0138–0147.

Durocher, J., Morin, N., & Blondin, P. (2006). Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. *ELSEVIER*, 65, 102–115. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.009>

El-Sheikh Ali, H., Kitahara, G., Takahashi, T., Mido, S., Sadawy, M., Kobayashi, I., Osawa, T. (2017). Plasma anti-müllerian hormone profile in heifers from birth through puberty and relationship with puberty onset. *Biology of Reproduction*, 97(1), 153–161.

Fernández Sánchez, M. (2008). El ciclo estral de la vaca. Zaragoza - España.

Filipiak, Y., Viqueira, M., & Bielli, A. (2016). Development and follicular dynamics from fetal life until puberty in cattle. Retrieved from Veterinaria (Montevideo) website: [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-48092016000200002&lng=es&tlng=.](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-48092016000200002&lng=es&tlng=)

Fricke, P. M. (2002). Scanning the Future — ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 85, 1918–1926.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74268-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74268-9)

Furukawa, E., Masaki, T., Sakaguchi, K., Bo, M., Yanagawa, Y., & Ueda, K. (2020).

- Relationship between the timing of the first postpartum ovulation and antral follicle counts in Holstein cows. *Journal of Ovarian Research*, 13(5), 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13048-020-0610-5>
- Galina, C., & Valencia, J. (2008). *Reproduccion de los animales domesticos* (Tercera). México.
- Gan, S., & Patel, K. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 1–3. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>
- Gautam, D., Vats, A., Pal, P., Haldar, A., & De, S. (2021). Characterization of anti-müllerian hormone (AMH) gene in buffaloes and goats. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/doi: 10.3389/fvets.2021.627094>
- Ginther, O. J. (2016). The theory of follicle selection in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*. <https://doi.org/doi: 10.1016/j.domaniend.2016.06.002>.
- Gobikrushanth, M., Dutra, P. A., Bruinjé, T. C., Colazo, M. G., Butler, S. T., & Ambrose, D. J. (2017). Repeatability of antral follicle counts and anti-Müllerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. *Theriogenology*, 92, 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.018>
- Gobikrushanth, M., Purfield, D. C., Canadas, E. R., Herlihy, M. M., Kearney, F. J., Colazo, M. G., ... Murray, M. (2019). Anti-Müllerian hormone in grazing dairy cows: Identification of factors affecting plasma concentration , relationship with phenotypic fertility , and genome-wide associations. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 11622–11635. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16979>
- González, M., De la Rosa, E., & Mendoza, C. (2017). Macroscopic morphometry of the corpus luteum of pregnant and non-pregnant zebu cows in the Colombian tropics. *Revista Colombiana Científica Animal*, 9(2), 190–197.
- Guáqueta, H. (2009). Ciclo estral : fisiología básica y estrategias para mejorar la detección de celos. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 56, 163–183.
- Guerreiro, B. M., Batista, E. O. S., Vieira, L. M., Sá Filho, M. F., Rodrigues, C. A., Castro Netto, A., ... Baruselli, P. S. (2014). Plasma anti-mullerian hormone: An endocrine marker for invitro embryo production from Bos taurus and Bos indicus donors. *Domestic*

- Animal Endocrinology*, 49(1), 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2014.07.002>
- Gutiérrez-Lizarazo, D., & Báez-Sandoval, G. (2014). Ultrasonography of the bovine. 19(1), 99–106.
- Hafez, E. (2002). Reproducción e inseminación artificial en animales (Séptima). México.
- Hanzen, C., Pieterse, M., Scenczi, O., & Drost, M. (2000). Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation per rectum. *Journal the Veterinary*, 159, 161–170.
- Hendriksen, P. J. M., Gadella, B. M., Vos, P. L. A. M., Mullaart, E., Kruij, T. A. M., & Dieleman, S. J. (2003). Follicular dynamics around the recruitment of the first follicular wave in the cow. *Biology of Reproduction*, 69, 2036–2044. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.019828>
- Hernández, J. (2016). Fisiología clínica de la reproducción de los bovinos lecheros. (Primera). México.
- Hirayama, H., Kageyama, S., Naito, A., Fukuda, S., Fujii, T., & Minamihashi, A. (2012). Prediction of superovulatory response in japanese black cattle using ultrasound, plasma anti-müllerian hormone concentrations and polymorphism in the ionotropic glutamate receptor AMPA1/GRIA1. *Journal of Reproduction and Development*, 58(3), 1–4.
- Ilha, G. F., Rovani, M. T., Gasperin, B. G., Ferreira, R., Macedo, M. P. De, Neto, O. A., ... Gonc, P. B. D. (2016). Regulation of Anti-Müllerian Hormone and Its Receptor Expression around Follicle Deviation in Cattle. *Journal of Reproduction in Domestic Animals*, 51, 188–194. <https://doi.org/10.1111/rda.12662>
- IMV. (2020). Bovine reproduction clinical ultrasound booklet with easi-scan : Recuperado de <https://www.imv-imaging.com/international/veterinary-learning/bovine-learning/reproductive-tract/clinical-ultrasound-booklet-with-easi-scan-go/>
- Ireland, J. J. A., Smith, G. W. B., Scheetz, D. A., & Folger, J. K. A. (2011). Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility , utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reser. *Reproduction, Fertility and Development*, 23, 1–14.
- Ireland, J. L. H., Scheetz, D., Themmen, A. P. N., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G. W., ...

- 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(September), 1219–1225. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071670>
- Ireland, J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J. L. H., Smith, G. W., Lonergan, P., & Evans, A. C. O. (2007). Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human Reproduction*, 22(6), 1687–1695. <https://doi.org/doi:10.1093/humrep/dem071>
- Jane, A. (2016). The estrous cycle of cattle.
- Jaton, C., Koeck, A., Sargolzaei, M., Malchiodi, F., Price, C. A., Schenkel, F. S., & Miglior, F. (2016). Genetic analysis of superovulatory response of holstein cows in canada. *Journal of Dairy Science*, 1–12. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10349>
- Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D. M., Neuder, L. M., Ireland, J. L. H., Pursley, J. R., Smith, G. W., ... Ireland, J. J. (2015). Concentration of anti-müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. *Journal of Dairy Science*, 1–10. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8130>
- Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D. M., Neuder, L. M., Pursley, J. R., & Ireland, J. J. (2017). A single ultrasound determination of ≥ 25 follicles ≥ 3 mm in diameter in dairy heifers is predictive of a reduced productive herd life. *Journal of Dairy Science*, 100(6), 5019–5027. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12277>
- Jyoti, S., Subedi, D., Adhikari, B. K., & Kaple, K. (2019). Ultrasonographic descriptions of reproductive tracts of cattle , history of veterinary ultrasound and its current practice in nepal ultrasonographic descriptions of reproductive tracts of cattle , history of veterinary ultrasound and its current practice. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1(3), 48–53. <https://doi.org/10.36349/EASJVMS>
- Lefebvre, R. C., & Gnemmi, G. (2009). Anatomy of the Reproductive tract of the cow.
- Lemma, A. (2013). The role of trans-rectal ultrasonography in artificial insemination program. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/52721>
- Lima, M. A., Morotti, F., Bayeux, B. M., Rezende, R. G., Botigelli, R. C., Camara de Bem, T. H., ... Seneda, M. M. (2020). Ovarian follicular dynamics , progesterone concentrations , pregnancy rates and transcriptional patterns in *Bos indicus* females with a high or low

- antral follicle count. *Scientific Reports*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76601-5>
- Loor Mendoza, I., Zambrano, J., Jácome Aucay, A., Dutan Sanango, J., & Ayala Guanga, L. (2021). Comparison of two techniques for counts of antral follicles larger than 4 mm in slaughtered heifers. *Revista de Producción Animal*, 33(3).
- Meczekalski, B., Czyzyk, A., Kunicki, M., Podfigurna-Stopa, A., Plociennik, L., Jakiel, G., ... Lukaszuk, K. (2016). Fertility in women of late reproductive age: the role of serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels in its assessment. *Journal of Endocrinological Investigation*, 39(11), 1259–1265. <https://doi.org/10.1007/s40618-016-0497-6>
- Medan, M. S., & El-aty, A. M. (2010). Advances in ultrasonography and its applications in domestic ruminants and other farm animals reproduction. *Journal of Advance Research*, 1, 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.03.003>
- Menezes, M., Léga, E., & Coelho, L. (2011). Utilização da ultrassonografia por via transretal em vacas da raça girolando para acompanhamento do desenvolvimento embrionário e/ou fetal 26 a 181 dias de gestação. *Nucleus Animalium*, 3(1), 37–60. <https://doi.org/10.3738/1982.2278.492>
- Mogollón-Waltero, E. M., & Burla-Dias, A. J. (2013). Superovulación de hembras bovinas: alternativas para reducir el número de inyecciones de FSH. *Spei Domus*, 9(18), 37–47.
- Monniaux, D., Drouilhet, L., Rico, C., Estienne, A., Jarrier, P., Touze, J., ... Fabre, S. (2013). Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. *Reproduction, Fertility and Development*, 25, 1–16. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1071/RD12270>
- Regulation
- Morris et al. (1993). A note on ovarian measurements in cows with or without a history of twinning. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 36(2), 237–241. <https://doi.org/10.1080/00288233.1993.10417759>
- 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. *Reproduction and Fertility*, 1–31.
- Mossa, F., Walsh, S. W., Butler, S. T., Berry, D. P., Carter, F., Lonergan, P., ... Evans, A. C. O. (2012). Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95(5), 2355–2361.

<https://doi.org/10.3168/jds.2011-4325>

- Nabors, B., & Linford, R. (2015). Anatomy of the reproductive system of the Cow. In Richard M. Hopper (Ed.), *Bovine Reproduction* (First).
- Nagai, K., Yanagawa, Y., Katagiri, S., & Nagano, M. (2015). Fertilizability of oocytes derived from holstein cows having different antral follicle counts in ovaries. *Animal Reproduction Science*. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.009>
- Nagashima JB, Hansen, B., Songsasen, N., Travis, A., & Place, N. (2016). Anti-mullerian hormone in the domestic dog during the anestrus to oestrous transition. *Reproduction in Domestic Animals*, 51, 158–164. <https://doi.org/10.1111/rda.12660>
- Niswender, G. D., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K., & McIntush, E. W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. In *Control of the corpus luteum* (Vol. 80, pp. 1–29).
- Noseir, W. M. B. (2003). Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. *BioMed Central*, 1(50), 1–6. Recuperado de <http://www.rbej.com/content/1/1/50>
- Ochoa, J. C., Peñagaricano, F., Baez, G. M., Melo, L. F., Motta, J. C. L., Garcia-Guerra, A., ... Wiltbank, M. C. (2018). Mechanisms for rescue of corpus luteum during pregnancy: gene expression in bovine corpus luteum following intrauterine pulses of prostaglandins E₁ and F₂ α†. *Biology of Reproduction*, 98(4), 465–479. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox183>
- Pansani, M., & Beltra, M. (2009). Anatomia e fisiologia do aparelho reprodutor de fêmeas bovinas. *Revista Científica Electronica de Medicina Veterinaria*, 12.
- Park, M., Suh, D.-S., Lee, K., & Bae, J. (2014). Positive cross talk between FOXL2 and antimullerian hormone regulates ovarian reserve. *Fertility and Sterility*, 102(3), 847–855.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.05.031>
- Pérez-Sandoval, L., Dubeibe.Marín, D., Chávez-Rodríguez, A., García-Jiménez, J., & Velasco-Acosta, D. (2019). Superovulatory response in Brahman donor cows using follicular ablation before superovulation protocols. *Journal MVZ Cordoba*, 24(2), 7203–7208.
- Perry, G., & Cushman, R. (2016). “Invited Review: Use of ultrasonography to make reproductive management decisions.” 32(154.161).

- Pimenta, A., Oliveira, J., & Meira, C. (2010). Dinâmica folicular ovariana comparativa entre as espécies bovina e equina. *PubVet*, 4(8).
- Restrepo, G. (2010). Algunos factores relacionados con la dinámica folicular en Bos Indicus. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5577–5586.
- Ribeiro, E. S., Bisinotto, R. S., Lima, F. S., Greco, L. F., Morrison, A., Kumar, A., & Thatcher, W. W. (2014). Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6888–6900. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7908>
- Rico, C., Fabre, S., Medigue, C., Clemente, N. d., Clement, F., Bontoux, M., ... 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), 50–59. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072157>
- Rico, Charlene, Medigue, C., Fabre, S., Jarrier, P., Bontoux, M., Clement, F., & Monniaux, D. (2011). Regulation of antimüllerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels. *Biology of Reproduction*, 84, 560–571. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088187>
- Rico et al. (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, 50–59. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072157>
- Rippe, C. (2009). El ciclo estral, 111–115.
- Rodgers, R. J., & Irving-Rodgers, H. F. (2010). Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction and Fertility*, 139, 309–318. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0177>
- Rosa, G. A., Chada Baracat, E., & Silva de Sá, M. F. (2018). About the anti-müllerian hormone (AMH) uses in the clinical practice sobre os usos do hormônio anti-Mülleriano na prática clínica . *Revista Brasileira de Ginecologia y Obstetricia*, 40, 661–663. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00529>
- Rosales, A., Guzmán, A., & Gutiérrez, C. (2012). Follicular development in domestic ruminants. *Redalyc*, 15(1), 147–160.
- Sabuncu, A., Dal, G., Enginler, S., Kocak, O., & Arici, R. (2019). Association of anti-Müllerian hormone concentrations between the pregnancy rates and pregnancy continuity of cows in different age groups. *Veterinarni Medicina*, 64, 302–308.

- 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*, 3, 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12958-019-0534-3>
- Shimizu, T. (2016). Molecular and cellular mechanisms for the regulation of ovarian follicular function in cows. *Journal of Reproduction and Development*, 62(4), 323–329.
- Silva-Santos, K. C., Gomes dos Santos, G. M., Schmidt Siloto, L., Tonello dos Santos, J., Raelle de Oliveira, E., Zandonadi Machado, F., ... Marcondes Seneda, M. (2014). The correlation between the number of antral follicles and ovarian reserves (preantral follicles) in purebred *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *Animal Reproduction Science*, 151(3–4), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.10.016>
- 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>
- Sonigo, C., Beai, I., Binart, N., & Grynberg, M. (2019). Anti-Müllerian hormone in fertility preservation : clinical and therapeutic applications. *SAGE*, 13, 1–7. <https://doi.org/10.1177/1179558119854755>
- Souza, A. H., Carvalho, P. D., Rozner, A. E., Vieira, L. M., Hackbart, K. S., Bender, R. W., ... Wiltbank, M. C. (2014). Relationship between circulating anti-müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 1–10. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8182>
- Souza, A. H., Carvalho, P. D., Rozner, A. E., Vieira, L. M., Hackbart, K. S., Bender, R. W., ... Wiltbank, M. C. (2015). Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(1), 169–178. <https://doi.org/DOI:10.3168/jds.2014-8182>.
- Succu, S., Sale, S., Ireland, J. J., Evans, A. C. O., Atzori, A. S., & Mossa, F. (2020). Exposure of dairy cows to high environmental temperatures and their lactation status impairs establishment of the ovarian reserve in their offspring. *Journal of Dairy Science*, 103(12), 11957–11969. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18678>
- Tarasconi, B., Tadros, T., Ayoubi, J.-M., Belloc, S., Ziegler, D., & Fanchin, R. (2017). Serum

antimüllerian hormone levels are independently related to miscarriage rates after in vitro fertilization – embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 108(3), 518–524. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.07.001>

Thatcher, W. W. (2017). A 100-year review : historical development of female reproductive physiology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10272–10291. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13399>

Valle Díaz, T. (2008). Dinámica folicular ovárica durante el ciclo estral en vacas doble propósito (pp. 1546–1553).

Vásquez, J., & Olivera, M. (2010). Cellular signaling in the bovine antral follicles. *Revista ORINOQUIA*, 14(2), 178–187.

Visser, J. A., & Themmen, A. P. N. (2014). Molecular and Cellular Endocrinology Role of anti-Müllerian hormone and bone morphogenetic proteins in the regulation of FSH sensitivity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 460–465. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.08.012>

Whitfield, L. (2018). Ovarian ultrasound for fertility management in dairy cattle. In *Cattle* (Vol. 23).

Wiltbank, M. C., Salih, S. M., Atli, M. O., Luo, W., Bormann, C. L., Ottobre, J. S., ... Sartori, R. (2012). Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. *Journal Animal Reproduction*, 9(3), 242–259.

Anexos

Anexo A. Plantillas para la recolección de datos de los ovarios muestreados



Universidad de Cuenca
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia



Evaluación de los niveles de hormona Antimülleriana valorada pre-mortem y su relación con las características morfológicas ováricas observadas pos mortem en vacas Holstein mestizas

ULTRASONOGRAFIA

Fecha:

#MUESTRA	Ovario	Número total de folículos	Folículos <3mm	Folículos 3 – 5 mm	Folículos > 5 y < 10mm	Folículos >10mm	Tamaño del Ovario	Tamaño del Cuerpo luteo
	DERECHO							
	IZQUIERDO							
#MUESTRA	Ovario	Número total de folículos	Folículos <3mm	Folículos 3 – 5 mm	Folículos > 5 y < 10mm	Folículos >10mm	Tamaño del Ovario	Tamaño del Cuerpo luteo
	DERECHO							
	IZQUIERDO							
#MUESTRA	Ovario	Número total de folículos	Folículos <3mm	Folículos 3 – 5 mm	Folículos > 5 y < 10mm	Folículos >10mm	Tamaño del Ovario	Tamaño del Cuerpo luteo
	DERECHO							
	IZQUIERDO							



Universidad de Cuenca
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia



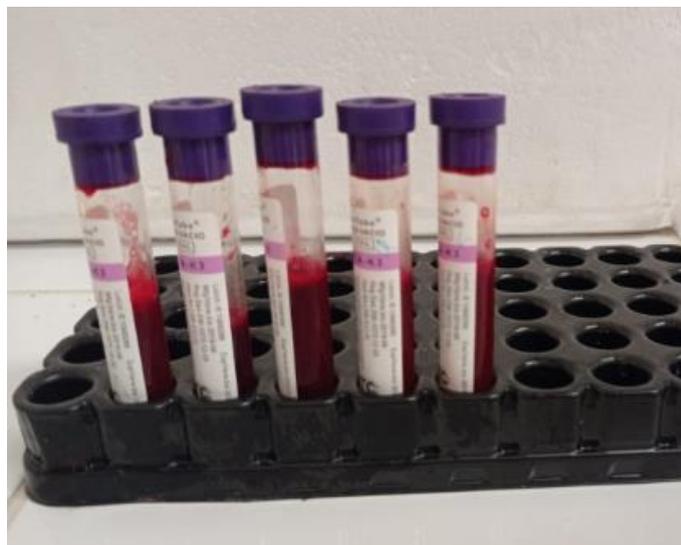
Evaluación de los niveles de hormona Antimülleriana valorada pre-mortem y su relación con las características morfológicas ováricas observadas pos mortem en vacas Holstein mestizas

MUESTRA	OVARIO	TAMAÑO DEL OVARIO	TAMAÑO DEL CUERPO LUTEO	PESO TOTAL DEL OVARIO	PESO DEL CUERPO LUTEO	UBICACIÓN CL	COLOR CL
	DERECHO						
	IZQUIERDO						
	DERECHO						
	IZQUIERDO						
	DERECHO						
	IZQUIERDO						
	DERECHO						
	IZQUIERDO						
	DERECHO						
	IZQUIERDO						
	DERECHO						
	IZQUIERDO						
	DERECHO						
	IZQUIERDO						

Anexo B. Selección de las unidades experimentales



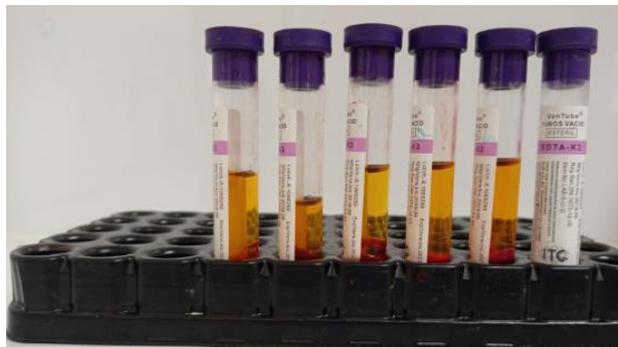
Anexo C. Muestras sanguíneas recolectadas de la vena yugular de la vaca.



Anexo D. Transporte de las muestras sanguíneas recolectadas



Anexo E. Muestras sanguíneas centrifugadas



Anexo F. Muestras congeladas de plasma bovino



Anexo G. Recolección y almacenaje de los ovarios bovinos



Anexo H. Medición y pesaje de los ovarios/ folículos



Anexo I. Enucleación del cuerpo lúteo



Anexo J. Medición del ovario y cuerpo lúteo mediante ultrasonografía



Anexo K. Medición del nivel de concentración de la hormona anti-mülleriana – Kit de ELISA

