



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“Relación entre Niveles de Hormona Antimulleriana y recuento de folículos antrales en vaquillas Holstein mestizas pre y pos faenamiento”

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

Autoras:

Sonia Cristina Gañan Chalco

CI: 0105706485

soniatiti24@hotmail.com

Karina Paola Londa Simbaña

CI: 0105201636

karinalond@hotmail.com

Director:

Luis Eduardo Ayala Guanga PhD

CI: 0102635463

Cuenca - Ecuador

20-mayo-2020



Resumen

El objetivo del presente estudio fue determinar la relación entre niveles de hormona Antimulleriana (AMH) pre-morten, recuento de folículos antrales (RFA) y la morfología ovárica pos-morten, en vaquillas Holstein mestizas que llegaron a ser faenadas en camales de las provincias de Cañar y Azuay. En primera instancia previo al faenamamiento se tomó 4ml de sangre mediante venopunción coccígea para medir los niveles plasmáticos de AMH, con el kit DL-AMH-b (Develop®). Post-morten, se recuperaron los ovarios de las vaquillas valoradas anteriormente. Se efectuaron dos métodos para el recuento folicular antral (RFA) y medida de los ovarios. El primero mediante un ecógrafo (Prosound 2), con transductor lineal, 7,5 Mhz y el segundo por visión directa; clasificando en 2 grupos: folículos <4mm y >4mm. Además, se realizó dos grupos de animales en base a los niveles de AMH (alto y bajo). El valor promedio general de AMH obtenido fue de $0,08 \pm 0,006$ ng/ml. Al valorar el RFA<4mm se determinó un promedio de $16,76 \pm 1,34$ folículos en el grupo (bajo) y $37,66 \pm 2,48$ folículos en el grupo (alto), con diferencia significativa ($P < 0,05$); esto se observó también en el RFA por el método ecográfico en el RFA<4mm, promedio de $20,94 \pm 1,14$ folículos (alto) y de $11,46 \pm 0,95$ folículos (bajo), resultados que difieren al RFA>4mm con promedio de $7,36 \pm 0,47$ folículos (alto), y $5,83 \pm 0,37$ folículos (bajo), sin diferencia ($P > 0,05$). En las características morfológicas se encontró diferencia ($P < 0,05$) en el tamaño del ovario derecho ($24,2 \pm 0,67$ mm) que fue mayor en el grupo alto, en comparación con el bajo ($21,7 \pm 0,47$ mm). Al igual que en el ovario izquierdo grupo alto ($21,2 \pm 0,53$ mm) y grupo bajo ($18,9 \pm 0,44$ mm). Similar tendencia se observó en el peso del ovario derecho en el grupo alto ($9,07 \pm 0,62$ g) y bajo ($7,42 \pm 0,42$ g). Sin embargo, cuando se comparó el tamaño del cuerpo lúteo en los grupos alto ($15,4 \pm 0,64$ mm) y bajo ($14,1 \pm 0,66$ mm) se observaron valores similares ($P > 0,05$). En conclusión, se determinó una correlación positiva y significativa entre los niveles de AMH evaluada (pre-morten) y el RFA en los ovarios valorados directamente pos-morten.

Palabras clave: hormona Antimulleriana, folículos, bovinos, ELISA.



Abstract

The aim of the present study was to determine the relationship between pre-mortem Anti-mullerian hormone (AMH), antral follicle count (RFA) and post-mortem ovarian morphology, in crossbred Holstein heifers that were slaughtered in slaughterhouses from Cañar and Azuay provinces. In the first instance before to slaughter, 4 ml of blood was taken by coccygeal venipuncture to measure plasma AMH levels, using the DL-AMH-b kit (Develop®). Post mortem, the ovaries were recovered from the heifers previously assessed. Two methods were performed for antral follicular count (RFA) and measurement of the ovaries. The first utilizing an ultrasound scanner (Prosound 2), with a linear transducer, 7.5 Mhz and the second by direct vision; classifying them into 2 groups <4mm and >4mm. The classification was made in groups of high and low AMH levels. The general average AMH value obtained was 0.08 ± 0.006 ng / ml. When evaluating RFA <4mm, an average of 16.76 ± 1.34 follicles was determined in the group (low) and 37.66 ± 2.48 follicles in the group (high), with a significant difference ($P < 0.05$); This was also observed in the RFA by the ultrasound method in the RFA <4mm, establishing an average of 20.94 ± 1.14 follicles (high) and 11.46 ± 0.95 follicles (low), results that differ from RFA > 4mm with an average of 7.36 ± 0.47 follicles (high), and 5.83 ± 0.37 follicles (low), without a difference ($P > 0.05$). In the morphological characteristics, a significant difference ($P < 0.05$) was found in the size of the right ovary (24.2 ± 0.67 mm) that was greater in the high group, compared to the low group (21.7 ± 0.47 mm). As in the left ovary, the high group (21.2 ± 0.53 mm) and the low group (18.9 ± 0.44 mm). A similar trend was observed in the weight of the right ovary in the high group (9.07 ± 0.62 g) and low (7.42 ± 0.42 g). However, when the corpus luteum size was compared in the high (15.4 ± 0.64 mm) and low (14.1 ± 0.66 mm) groups, similar values were observed ($P > 0.05$). As a conclusion, a positive and significant correlation was found between the levels of AMH evaluated (pre-mortem) and the RFA in the ovaries assessed directly post-mortem.

Keywords: Anti-mullerian hormone, follicles, bovines, ELISA.



ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 General	19
2.2 Específicos.....	19
2.3 Hipótesis	19
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 Anatomía y fisiología de la reproducción bovina	20
3.1.1 Ovarios	20
3.1.2 Cuerpo Lúteo (CL).....	21
3.1.3 Folículos	21
3.2 Dinámica folicular	22
3.2.1 Desarrollo folicular	23
3.2.2 Desarrollo de folículos antrales pequeños.....	23
3.2.3 Fases del desarrollo folicular	24
3.3 Ciclo estral	26
3.3.1 Generalidades	26
3.3.2 Control neuroendocrino del ciclo estral.....	27
3.3.3 Etapas del ciclo estral.....	28
3.4 Hormona Antimulleriana.....	31
3.4.1 Propiedades	31
3.4.2 Hormona Antimulleriana en humanos.....	32
3.4.3 Hormona Antimulleriana en el ganado bovino	32
3.4.4 El papel de la AMH en el ovario.....	34
3.5 Ultrasonografía.....	36
3.5.1 Elección del equipo de ultrasonografía	37
3.5.2 Estructuras fisiológicas visibles en el ovario por el ecógrafo	38
3.5.3 Morfología ultrasonográfica del cuerpo lúteo	38
4. MATERIALES Y MÉTODOS	40



4.1	Materiales.....	40
4.1.1	Materiales Biológicos.....	40
4.1.2	Materiales Químicos.....	40
4.1.3	Materiales de Laboratorio.....	40
4.1.4	Materiales de Oficina.....	40
4.1.5	Materiales de Campo.....	41
4.2	Métodos.....	41
4.2.1	Área de estudio.....	41
4.2.2	Unidad experimental.....	42
4.2.3	Metodología para la Investigación.....	43
4.3	Diseño experimental.....	46
4.3.1	Análisis estadístico.....	47
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
5.1	Niveles de la hormona Antimulleriana (AMH), valorado pre-mortem ..	48
5.2	Recuento Folículos Antrales (RFA), realizado en forma visual y ecográfica en ovarios colectados pos-mortem.....	49
5.2.1	Recuento Folículos Antrales (RFA) <4mm, realizado en forma visual directa y ecográfica.....	49
5.2.2	Recuento Folículos Antrales (RFA) >4mm, realizado en forma visual directa y ecográfica.....	50
5.3	Resultados de AMH en grupos de alta y baja concentración.....	51
5.4	Relación de recuento de folículos antrales (RFA) <4mm y >4mm, con los grupos clasificados como de bajo y alto nivel de AMH, mediante las técnicas de ecografía y conteo directo (visual).....	53
5.4.1	Relación del RFA <4mm por el método Ecográfico con el grupo de bajo y alto nivel de AMH.....	53
5.4.2	Relación del RFA >4mm por el método Ecográfico con el grupo de bajo y alto nivel de AMH.....	54
5.5	Valoración del RFA <4mm y >4mm por el método visual con el grupo de bajo y alto nivel de AMH.....	56



5.6	Valores promedios de la morfología del ovario (OD y OI), cuerpo lúteo (CLI y CLD) de las 102 vaquillas en estudio	58
5.6.1	Peso promedio y error estándar de los ovarios derecho (OD) e izquierdo (OI)	58
5.6.2	Peso promedio y error estándar del cuerpo Lúteo.....	58
5.6.3	Tamaño promedio y error estándar de los ovarios derecho (OD) e izquierdo (OI)	60
5.6.4	Tamaño promedio y error estándar del cuerpo lúteo (CL).....	61
5.7	Resultados entre los grupos de vaquillas clasificadas con altos y bajos niveles de AMH y su relación con el tamaño y peso de los ovarios, así como del cuerpo lúteo	62
5.7.1	Tamaño promedio y error estándar de los ovarios (OD; OI) y del cuerpo lúteo (CL)	62
5.7.2	Peso promedio y error estándar de los ovarios (OD; OI) y del cuerpo lúteo (CL)	64
5.8	Valores promedios de la Hormona Antimulleriana (AMH), el Recuento visual y ecográfico de los Folículos Antrales (RFA), mayores y menores a 4mm, en diferentes momentos del ciclo estral, así como del número de onda folicular y la fase de la misma.....	65
5.8.1	Promedio del Recuento visual y ecográfico de los Folículos Antrales (RFA) >4mm y <4mm en las fases del ciclo estral (metaestro, diestro y proestro), y niveles de AMH.....	66
5.8.2	Promedio del Recuento visual y ecográfico de los Folículos Antrales (RFA) > y <4mm encontrados en la primera, segunda o tercera onda folicular, así como los niveles de AMH.....	68
5.8.3	Promedio del Recuento visual y ecográfico de los Folículos Antrales (RFA) >4mm y <4mm encontrados en la fase de reclutamiento, selección y dominancia de las diferentes ondas foliculares de las 102 vaquillas en estudio, así como los valores de la AMH	70
6.	CONCLUSIONES	73
7.	RECOMENDACIONES	74
8.	BIBLIOGRAFÍA	75
9.	ANEXOS	86



9.1 Fotografías de la Investigación. 86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Crecimiento Folicular..... 26

Figura 2: Esquema de interacción hormonal hipotálamo-hipófisis..... 27

Figura 3: Etapas del ciclo estral. 30

Figura 4: Etapas del ciclo estral, ovarios..... 31

Figura 5: Rol de la AMH en la foliculogénesis. 35

Figura 6: Ubicación del área de estudio (Azuay y Cañar). 41

Figura 7: Tamaño del cuerpo lúteo durante el ciclo estral de vaquillas Holstein, Brown Swiss y Criollas 45

Figura 8: Valores promedios de la Hormona Antimulleriana (AMH), en los grupos clasificados como de bajo y alto nivel de AMH, valorado pre-morten. 53

Figura 9: Valores promedios y error estándar del recuento mediante ecografía de los folículos antrales <4mm (RFA<4mm) y de los folículos antrales >4mm (RFA>4mm), en los grupos clasificados como de bajo (blanco) y alto nivel de AMH (plomo). 56

Figura 10: Valores promedios y error estándar del recuento visual de los folículos antrales <4mm (RFA<4mm) y el recuento visual de los folículos antrales >4mm



(RFA>4mm), en los grupos clasificados como de bajo (blanco) y alto nivel de AMH (plomo). 57

Figura 11: Comparación del tamaño promedio de los ovarios derecho (OD) e izquierdo (OI) y del cuerpo lúteo (CL), en los grupos clasificados como de bajo y alto nivel de AMH. 63

Figura 12: Comparación del peso promedio de los ovarios derecho (OD) e izquierdo (OI) y del cuerpo lúteo (CL), en los grupos clasificados como de bajo y alto nivel de AMH. 65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valores descriptivos de los niveles de Hormona Antimulleriana (AMH), el Recuento Visual y ecográfico de los Folículos Antrales (RFA). 51

Tabla 2: Valores promedios del peso de los ovarios derecho e izquierdo, así como, del cuerpo lúteo de las 102 vaquillas en estudio. 60

Tabla 3: Valores promedios del tamaño de los ovarios derecho e izquierdo, así como, del cuerpo lúteo de las 102 vaquillas en estudio. 61

Tabla 4: Valores promedios de la Hormona Antimulleriana (AMH), recuento visual y ecográfico de los folículos antrales (RFA), mayores y menores a 4mm, en diferentes momentos del ciclo estral: metaestro (n=26), diestro (n=49) y proestro (n=27), del total de anima. 67

Tabla 5: Valores promedios de la Hormona Antimulleriana (AMH), el Recuento Visual y ecográfico de los Folículos Antrales (RFA), mayores y menores a 4mm, en la primera (n=7), segunda (n=54) y tercera (n=41) onda folicular del total de animales en estudio (n=102) 70



Tabla 6: Valores promedios de la Hormona Antimulleriana (AMH), el Recuento Visual y ecográfico de los Folículos Antrales (RFA), mayores y menores a 4mm, observados en la fase de reclutamiento (n=56), selección (n=27) y dominancia (n=56) de las diferentes ondas. 72

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Ecografías tomadas del ovario.	86
Anexo 2: Ovarios y sus estructuras (valoración en forma directa-visual).	88
Anexo 3: Obtención y procesamiento de las muestras de sangre.....	90
Anexo 4: Procedimiento para medición cuantitativa in vitro de AMH.	92
Anexo 5: Recuperación de ovarios en el Camal.....	94
Anexo 6: Procesamiento de ovarios en el Laboratorio.	95
Anexo 7: Plantilla para registro de datos: medida y peso del ovario y CL; Recuento de folículos.	97
Anexo 8: Plantilla para colección de datos de los ovarios derecho e izquierdo y RFA por dos métodos; directo (visual) y ecográfico.	98
Anexo 9: Modelo de registro para la recolección de datos para medición cuantitativa in vitro de AMH.....	99



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Sonia Cristina Gañan Chalco en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación ***“Relación entre Niveles de Hormona Antimulleriana y recuento de folículos antrales en vaquillas Holstein mestizas pre y pos faenamiento”***, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 20 de mayo del 2020

Sonia Cristina Gañan Chalco

C.I: 0105706485



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Karina Paola Londa Simbaña en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Relación entre Niveles de Hormona Antimülleriana y recuento de folículos antrales en vaquillas Holstein mestizas pre y pos faenamiento**", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 20 de mayo del 2020

Karina Paola Londa Simbaña

C.I: 0105201636



Cláusula de Propiedad Intelectual

Sonia Cristina Gañan Chalco, autora del trabajo de titulación "**Relación entre Niveles de Hormona Antimülleriana y recuento de folículos antrales en vaquillas Holstein mestizas pre y pos faenamiento**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 20 de mayo del 2020

Sonia Cristina Gañan Chalco

C.I: 0105706485



Cláusula de Propiedad Intelectual

Karina Paola Londa Simbaña, autora del trabajo de titulación "**Relación entre Niveles de Hormona Antimulleriana y recuento de folículos antrales en vaquillas Holstein mestizas pre y pos faenamiento**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 20 de mayo del 2020

Karina Paola Londa Simbaña

C.I: 0105201636



AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por ser quien guía el destino en mi vida, a mi familia por brindarme la ayuda absoluta y la confianza. A mis padres por ser ejemplos de perseverancia y constancia que me han infundado siempre, siendo así los pilares fundamentales en mi vida.

Agradezco inmensamente al Dr. Luis Ayala director de Tesis, por su completa paciencia, y por forjarnos a seguir adelante contribuyendo con sus conocimientos y experiencia. De igual forma al Dr. Rafael Ochoa por ayudarme a impulsar en mi formación personal y profesional.

A mis amigos colegas que mutuamente nos hemos apoyado, para llegar a un solo designio en lo largo de este viaje; a mi compañera de tesis Karina Londa, por la amistad, apoyo, confianza y la dedicación; con un solo objetivo que lo estamos logrando.

*A todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.
¡Gracias a ustedes!*

Sonia Cristina Gañan Chalco



AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por permitirme llegar donde estoy. A toda mi familia por el apoyo, la paciencia y la motivación que me brindan día a día.

Agradezco al Dr. Luis Ayala, director de Tesis, por su gran paciencia, compartirme sus conocimientos, guiarme y apoyarme en mis proyectos.

Muy agradecida con todos los docentes de mi carrera Universitaria, por compartirme sus conocimientos y motivarme a seguir adelante.

A mi compañera de tesis, Sonia, y a quienes me han apoyado durante este periodo de trabajo, en especial a los miembros del proyecto de investigación: "Rol de la hormona Antimülleriana para predecir la disponibilidad de folículos en vacas, que respondan a la superovulación y generen ovocitos o embriones competentes in vivo e in vitro".

Finalmente, un agradecimiento sincero para mis amigos(as) y compañeros(as) de aula por su apoyo desde el primer día de clases, han estado ahí y con ellos hemos vivido buenos y malos momentos, siempre los llevaré presentes.

¡Muchas Gracias!

Karina Paola Londa Simbaña



DEDICATORIA

A mis padres Victor y Diana por siempre estar en los momentos más difíciles, por su inmensa paciencia y amor. A Carolina por ser un ejemplo de hermana mayor, por brindarme motivación e inspiración. A toda mi familia por el sostén incondicional.

Sonia Cristina Gañan Chalco

Quiero dedicar este trabajo de tesis a mi amado hijo Mateo, quien ha sido mi aliento de superación y la motivación para seguir adelante con mis metas.

A mis Padres Mariana y Santiago, personas que admiro mucho, quienes siempre me han brindado su apoyo y han forjado a ser la persona que soy. A mis abuelos Paulina y Efraín. A mis hermanos Darwin, Flavio, Derlis, quienes siempre han estado apoyando cada paso que doy.

A mis amigos(as) y de manera especial a Adrián Calle y su familia, quienes siempre me han apoyado incondicionalmente durante mi carrera.

Con mucho cariño para Ustedes.

Karina Paola Londa Simbaña



1. INTRODUCCIÓN

El uso de las biotecnologías en la reproducción ha facilitado la difusión a nivel mundial de la genética de los animales de alto valor productivo. Si bien los protocolos de multiovulación y transferencia de embriones *in vivo* (MOET) han evolucionado durante los últimos 50 años (1); lamentablemente, los resultados obtenidos no han llegado a los parámetros esperados, estancándose en un promedio de 5 o 6 embriones transferibles por lavado en la raza Holstein a nivel mundial (2).

Uno de los factores que influye directamente en la respuesta superovulatoria y producción de embriones es la selección adecuada de la donadora, de allí que es importante que esta se encuentre sana, cíclica, condición corporal de 3-3,5 (escala de 1-5) y con buen historial de fertilidad (3);(4).

A pesar de que se realice una selección minuciosa de la donadora basado en los parámetros antes indicados, se ha demostrado que hay una alta variabilidad en la respuesta superovulatoria por parte de las donadoras y como tal en la producción de embriones, debido a la reserva folicular ovárica que es variable entre los individuos (5). Sin embargo, está descrito que existe alta repetibilidad del número de folículos antrales en las diferentes ondas foliculares de un mismo animal (6).

Basado en el principio de que el RFA se repite en un mismo animal, la técnica hoy en día utilizada para seleccionar posibles buenas donadoras, es el recuento de folículos antrales por ultrasonografía (7). Sin embargo, esta técnica requiere profesionales experimentados, habilidades técnicas, equipo costoso y evaluación cuidadosa de las imágenes de ultrasonido (8), ya que el número de folículos presentes en los ovarios está sujeto a variaciones cíclicas, asociadas con las ondas foliculares, lo cual complica aún más la interpretación de las imágenes (9).

Una alternativa que se viene trabajando en los últimos años es determinar marcadores endocrinos que permitan evaluar la reserva ovárica de las posibles



donadoras de embriones de forma precisa y confiable (10). En este contexto, se ha descrito que la hormona Antimulleriana (AMH) glicoproteína de 140 kDa que pertenece a la familia del factor de crecimiento transformante (TGF), producida específicamente por las células de la granulosa de folículos pre-antrales y antrales pequeños en crecimiento, podría utilizarse como marcador endocrino para predecir la respuesta ovárica de las vacas donadoras en diferentes momentos del ciclo estral (11);(12).

Si bien se ha determinado que existe correlación entre los niveles de la AMH y la población de folículos antrales presentes en el ovario de animales *Bos indicus* y *Bos taurus*, criados en el trópico bajo, en sistemas intensivos (13);(14). Los valores descritos de AMH en los animales con alto y bajo número de folículos antrales son muy variables (15);(16), posiblemente por las diferentes metodologías utilizadas en la determinación del RFA, el equipo de ultrasonografía utilizado en cada investigación, la experticia del técnico y el momento del ciclo estral en el cual se encontraba al ser valoradas, estas podrían ser las causas de estas variaciones (15);(17);(18).

De allí que sería interesante evaluar esta relación de la AMH con el RFA, pero en animales que van a ser faenados, combinando la toma de muestras de sangre para la valoración de la AMH en el patio de espera para faenamiento (*in vivo*) y el recuento de folículos antrales realizarlo directamente de los ovarios recuperados pos-mortem en forma visual y luego con ayuda de un ecógrafo, con la finalidad de evaluar la efectividad de estos dos métodos de valoración de RFA.



2. OBJETIVOS

2.1 General

Determinar la relación entre los niveles de hormona Antimulleriana (AMH) pre-morten, el recuento de folículos antrales (RFA) y la morfología ovárica pos-morten en vaquillas Holstein mestizas

2.2 Específicos

- Determinar los niveles de Hormona Antimulleriana (AMH) en vaquillas Holstein mestizas, previo al faenamiento y agrupar en animales con valores altos y bajos de AMH.
- Realizar el recuento de folículos antrales (RFA), en ovarios de matadero mediante dos métodos: observación directa y ultrasonografía.
- Describir el tamaño y peso de: los ovarios y el cuerpo lúteo.
- Establecer si los grupos de vaquillas con altos y bajos niveles de AMH guardan relación con el RFA y el tamaño y peso de los ovarios y cuerpo lúteo.

2.3 Hipótesis

Las vaquillas con niveles altos de hormona Antimulleriana pre-morten, poseen ovarios más grandes y mayor número de folículos antrales en comparación con los animales con bajos niveles de AMH.



3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Anatomía y fisiología de la reproducción bovina

Todo programa de reproducción animal y programas investigativos, están basados en el conocimiento de la anatomía y fisiología reproductiva, pues hay cambios en su topografía de acuerdo a la edad y actividad fisiológica (19). Este conocimiento representa la necesidad de dominar la exploración ecográfica, la dinámica folicular, fases del ciclo estral y otros aspectos en los cuales nos vamos a guiar para nuestro objetivo (19).

3.1.1 Ovarios

Los ovarios son órganos pares; en el bovino presentan un cuerpo irregular firme, de forma prácticamente ovoide algo aplastada y pequeña en relación al tamaño corporal (mide unos 4 x 2,5 x 1,5cm) (20). Uno de sus bordes, el hilio, está unido por el mesoovario al ligamento ancho, que lo une a la pared corporal inmediatamente antes de la entrada de la pelvis y al tracto reproductor (20).

El ovario tiene una zona periférica gruesa o corteza, que rodea la médula. La corteza se encuentra rodeada por el epitelio germinal (o germinativo), formado por células planas o cuboideas; el epitelio germinal es un epitelio mesotelial que recubre al ovario y corresponde así al peritoneo visceral ovárico, por lo tanto, la denominación de epitelio germinal resulta engañosa, ya que no da origen a tipo celular o estructura ovárica alguna (de él no germina nada) (20). Por dentro del epitelio germinativo existe una capa de tejido conjuntivo denso y resistente, muy rico en fibras colágenas, la túnica albugínea; en la corteza, rodeados por tejido conjuntivo correspondiente al estroma ovárico, por dentro de la túnica albugínea, se encuentran incluidos los folículos ováricos, los cuales contienen a los ovocitos; los folículos aparecen en la corteza en varios tamaños de acuerdo a su estado de desarrollo; la médula está constituida básicamente por tejido conjuntivo laxo conteniendo vasos sanguíneos tortuosos y grandes en relación al tamaño del ovario, así como nervios y vasos linfáticos (20).



3.1.2 Cuerpo Lúteo (CL)

El cuerpo lúteo es una glándula endocrina transitoria que sufre cambios dinámicos a lo largo de su vida útil; su formación, inducida por LH, implica un proceso complejo de diferenciación celular y neovascularización cuyo principal producto de secreción es la progesterona (21);(22). El CL desempeña un papel vital en múltiples procesos como el reconocimiento, la adhesión e implantación del conceptus, el mantenimiento de la gestación en sus estadios tempranos y la regulación de la dinámica folicular (22). Tiene una vida media de aproximadamente 17 a 18 días (23).

La progesterona secretada por el CL ejerce retroalimentación negativa sobre el hipotálamo e hipófisis para reducir la secreción de gonadotropinas y evitar ovulaciones. En las vacas no gestantes, la prostaglandina F2 alfa (PGF2), realiza su regresión con lo que se reduce la secreción de progesterona a niveles que se registraban antes de su formación (24). La regresión del cuerpo lúteo es funcional y estructural. En la regresión funcional se impide la síntesis y secreción de progesterona, pero la regresión estructural se realiza por medio de apoptosis y necroptosis de las células lúteas esteroideogénicas (24).

La formación de CL implica, a nivel celular, intensas interacciones entre células microvasculares (células endoteliales y pericitos), células esteroideogénicas y células inmunes migratorias, lo que lleva a la diferenciación celular, angiogénesis y remodelación de una amplia matriz extracelular (21).

3.1.3 Folículos

Son estructuras llenas de fluidos, que contienen los óvulos en desarrollo. Usualmente se pueden encontrar varios folículos en cada ovario, que varían en tamaño desde apenas visibles, hasta varios milímetros en diámetro (19). El folículo más grande sobre el ovario es considerado "el dominante", y es el que probablemente ovule cuando el animal entre en celo y con el tiempo, más del 95% de los otros folículos entran en regresión y mueren sin ovular, siendo reemplazados por una nueva generación de folículos en crecimiento (19).



En el caso de las vacas, los folículos se denominan de acuerdo con su tamaño: F5, cuando su diámetro aproximado sea de 5mm; F10 cuando sea 10mm, y así sucesivamente. Así mismo se clasifican en primarios o preantrales (menores de 4mm de diámetro), secundarios o antrales (de 4 a 9 mm de diámetro) y terciarios o de Graaf (mayores de 9mm) (25).

3.2 Dinámica folicular

Se conoce como dinámica folicular al proceso de crecimiento y regresión de folículos antrales que conducen al desarrollo de un folículo preovulatorio (20). Un ciclo estral bovino ocurren entre 1 y 4 ondas de crecimiento y desarrollo folicular, y el folículo preovulatorio deriva de la última onda (20).

La dinámica folicular ovárica bovina ha sido muy estudiada a través de diferentes técnicas, siendo las más aplicadas la ultrasonografía y la medición de niveles hormonales, mostrando variaciones que dependen de la genética, el estado fisiológico, el clima, la nutrición o el sistema de producción; el estudio de la dinámica folicular tiene como finalidad mejorar el conocimiento de los principios fisiológicos que rigen la producción de óvulos y de hormonas ováricas y su relación con el comportamiento reproductivo (26).

La dinámica folicular está mediada por una amplia gama de factores donde el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero juega un papel importante en la regulación hormonal; sin embargo, la dinámica folicular se produce desde las primeras semanas de desarrollo embrionario y al nacimiento la hembra posee un pool de folículos que podrá utilizar potencialmente durante su vida, folículos que en su mayoría sufrirán atresia mediada por el mecanismo de apoptosis; precedida por la foliculogénesis, permite la selección de un folículo el cual proporciona un ambiente adecuado para el desarrollo de un ovocito, el cual al nacimiento se encuentra en fase de diploteno y por acción hormonal puede llegar a la ovulación; además, la dinámica folicular en la hembra bovina permite el desencadenamiento de procesos como la pubertad, el ciclo estral, que permitirán la concepción, continuando con la gestación, parto y producción láctea (27).



3.2.1 Desarrollo folicular

El desarrollo folicular bovino durante un ciclo estral normal se caracteriza por un crecimiento en forma de ondas, con presencia de cohortes foliculares, de las cuales solo un folículo se torna ovulatorio, este crecimiento folicular también se produce durante el período prepuberal, puberal, primer tercio de la gestación y período de anestro posparto (26).

Los folículos preantrales se originan en la hembra desde la vida embrionaria con el surgimiento de las células germinales primordiales en el saco vitelino. El antro folicular es aquella cavidad formada por el acúmulo de fluido rico en hormonas esteroideas, especialmente estrógenos, el cual es formado en el folículo cuando este tiene entre 250 y 500 micras de diámetro (28).

Las ovogonias se desarrollan dentro de los folículos primordiales, se ha calculado que en el bovino durante su vida fetal cuentan con aproximadamente 2.700.000 folículos primordiales, al momento del nacimiento quedan unos 135.000 de estos; después del nacimiento las células pregranulosas que se encuentran rodeando las ovogonias sufren un proceso de diferenciación, cambiando su apariencia aplanada por una capa de células cúbicas y aquí se denominan folículos primarios, las células granulosas van proliferando y formando varias capas alrededor del ovocito (entre 2 y 6 capas), originan los folículos secundarios, posteriormente en la última fase de desarrollo, el folículo inicia la formación del antro y crece a gran velocidad formando el folículo terciario o antral, así finalmente, el folículo antral de mayor desarrollo destinado a la ovulación es denominado folículo de Graaf (29).

3.2.2 Desarrollo de folículos antrales pequeños

El folículo pequeño con reciente formación de su antro crece lentamente (tarda 27 días en pasar de 0,13 a 0,67 mm); a medida que aumenta su diámetro, se acelera la velocidad de crecimiento (6,8 días para pasar de 0,68 a 3,67 mm) (30). Se estima que se requieren 2 ciclos estrales para que un folículo pase de



preantral a antral y que este cambio no se relaciona con cambios en la concentración de gonadotropinas ni con la emergencia de ondas foliculares (30).

Estudios recientes reportan que la Hormona Folículo Estimulante (FSH) se une a sus receptores en las células granulosas de los folículos primarios, pero parece que esta unión es incapaz de activar el sistema de segundos mensajeros de la adenilciclase y, por lo tanto, no induce señalización celular para producción de proteínas, solamente cuando alcanzan de 1 a 3 mm de diámetro los folículos responden a FSH, se plantea que el futuro folículo dominante es el primero en alcanzar 1 mm de diámetro, emerge 6 a 12 horas antes del primer folículo subordinado y su tamaño es mayor (30).

Se sugiere que la formación del antro folicular es debida a que las células granulosas producen hialurona y versican (un proteoglicano tipo condroitin - sulfato) que generan un gradiente osmótico que atrae fluidos procedentes de los capilares de la teca (31). El inhibidor de la inter-alfa tripsina también se encuentra en este fluido; éste puede ligarse al versican o a la hialurona, resultando en la retención de estas moléculas dentro del antro folicular. Las acuaporinas (moléculas que facilitan el transporte de agua en la célula) también están presentes en las células granulosas, por lo que pueden encontrarse implicadas en el transporte de agua al interior del folículo (31).

3.2.3 Fases del desarrollo folicular

El desarrollo de los folículos antrales bovinos y su posterior selección y dominancia dependen de la sensibilidad de éstos a las gonadotropinas (32). Para describir la dinámica folicular bovina es necesario definir conceptos de reclutamiento, selección y dominancia (20).

3.2.3.1 Reclutamiento

Es el proceso por el cual una cohorte de folículos comienza a madurar en un medio con un aporte adecuado de gonadotropinas (principalmente FSH) que le permiten avanzar hacia la ovulación (33). Se caracteriza por el crecimiento simultáneo de 8 a 41 folículos hasta 4 mm de diámetro en los 2 ovarios (34).



3.2.3.2 Selección

Durante esta fase, el folículo seleccionado inhibe el desarrollo de los folículos que lo acompañan en la cohorte, al mismo tiempo que favorece su propio crecimiento a un tamaño entre 5-6mm (35).

3.2.3.3 Dominancia

Es el proceso por el cual el folículo seleccionado domina ejerciendo un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos. Este folículo alcanza un tamaño marcadamente superior a los demás, es responsable de la mayor secreción de estradiol y adquiere la capacidad de continuar su desarrollo en un medio hormonal adverso para el resto de los folículos (36). La causa por la cual regresa el folículo dominante de las primeras ondas (1 de 2 ondas y 2 de 3 ondas) sería la presencia de una baja frecuencia de los pulsos de LH, debido a los altos niveles de progesterona que provocarían una menor síntesis de andrógenos y en consecuencia una menor síntesis de estradiol que iniciarían la atresia folicular (36).

El mecanismo de selección del folículo dominante se basa en un cambio en la capacidad de respuesta a la FSH y a la LH, esto implica primero un descenso de la concentración de FSH propiciado por el estradiol y la inhibina producidos por todos los folículos en crecimiento, el folículo dominante desarrolla la capacidad de seguir creciendo con bajas concentraciones de FSH, que son insuficientes para los folículos más pequeños (23). Además, cuando el folículo dominante adquiere un diámetro de 8 mm comienza a desarrollar receptores para la LH en las células de la granulosa, que funciona como la FSH. Al final de la fase de crecimiento, dependiendo de si el cuerpo lúteo regresa o no, se producirá la ovulación o bien la pérdida de los receptores para la LH y la atresia del folículo dominante. Cuando cesa la secreción folicular de estradiol, la FSH vuelve a subir y ello desencadena la repetición del ciclo ovárico (37).

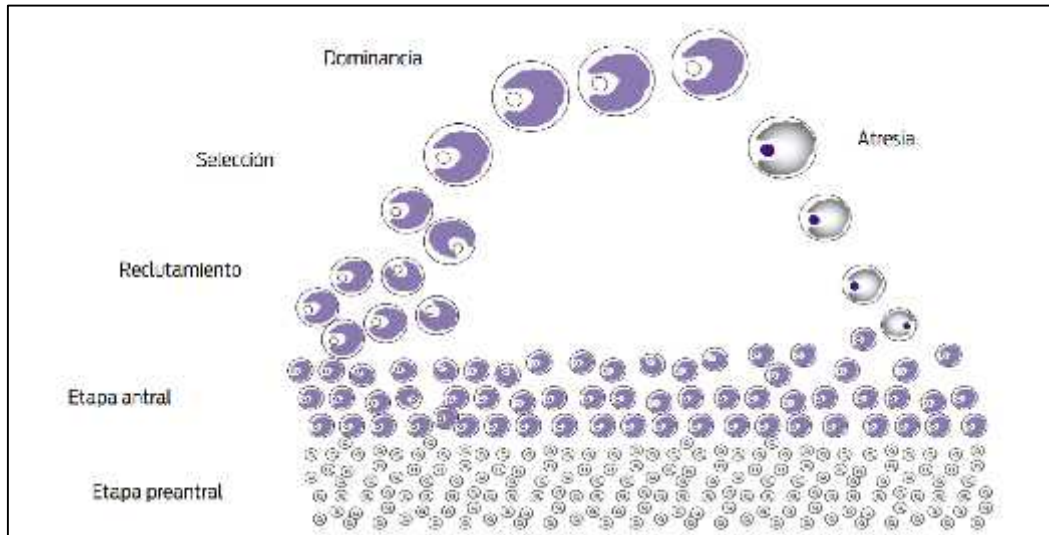


Figura 1: Crecimiento Folicular.

Fuente: (38).

3.3 Ciclo estral

3.3.1 Generalidades

El ciclo estral es una sucesión de eventos de origen endocrino, dependientes de la interacción de varios órganos como el eje hipotálamo-hipófisis, ovario y útero (23). Los cambios que ocurren en el comportamiento durante este tiempo son evidencia de la presentación del estro, que inicia con en la pubertad y continúan durante toda su vida útil, excepto en condiciones de preñez, anestro posparto o patologías. El periodo estral dura en promedio 21 días (26). Los signos de celo se presentan gracias a los estrógenos provenientes del folículo, durante 6 a 30 horas. La ovulación es espontánea y ocurre 12 horas luego de finalizado el celo (27). Se ha demostrado que más del 70% de las actividades de monta ocurren entre las 6 p.m. y las 6 a.m. Además, cerca del 25% de las vacas tienen celos de menos de 8 horas de duración (24).

La expresión del comportamiento de estro es el resultado de un incremento progresivo en los niveles de 17β -estradiol producido por un folículo dominante,

el cual estimula los demás signos concomitantes con el pico ovulatorio de la hormona luteinizante (39). El ciclo estral está conformado por cuatro fases continuas: proestro, estro, metaestro y diestro, durante las cuales sucede una serie de cambios en las estructuras ováricas y concentraciones de hormonas que interactúan para que la vaca pueda estar ciclando (40).

3.3.2 Control neuroendocrino del ciclo estral

El ciclo estral resulta de la coordinación fundamental de cuatro órganos: cerebro, hipófisis, ovarios y útero. La comunicación se realiza fundamentalmente a través de un sistema hormonal. Las principales hormonas involucradas son la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), secretada por el hipotálamo; la hormona Luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH); el estradiol (E2), la inhibina y la progesterona (P4) de origen ovárico; y la prostaglandina F2 alfa, secretada por el útero. Otras hormonas como la prolactina o los andrógenos también participan en la regulación del ciclo estral (37).

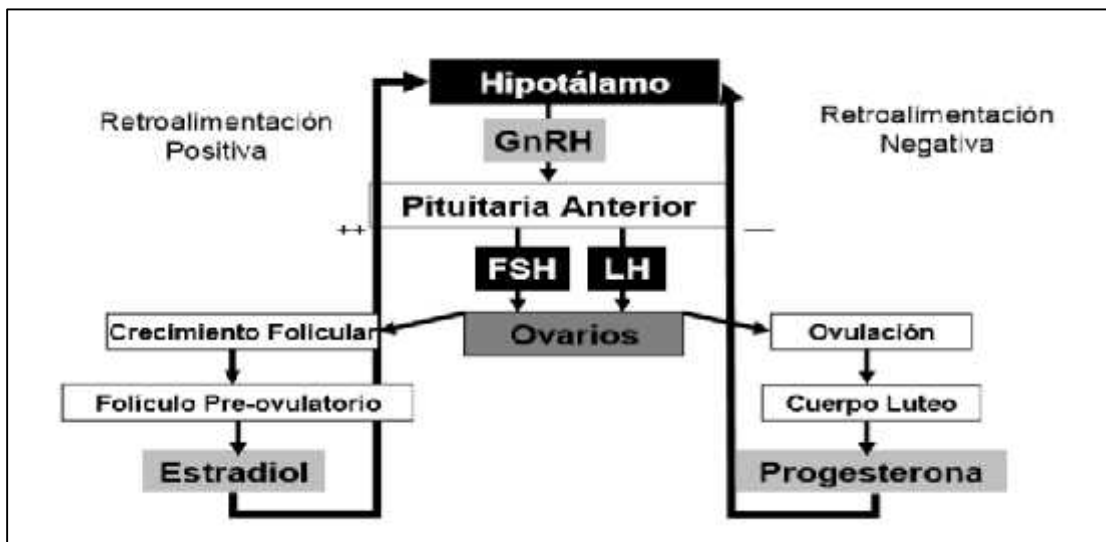


Figura 2: Esquema de interacción hormonal hipotálamo-hipófisis.

Fuente: (41).



3.3.3 Etapas del ciclo estral

3.3.3.1 Proestro

Comienza con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior y finaliza con la manifestación de celo, período cuya duración es de 3 días, manifiesta con una caída en los niveles de progesterona y esto a su vez disminuye el feed back negativo que dicha hormona a nivel hipotalámico y comienzan a aumentar la frecuencia pulsátil de las hormonas gonadotrópicas (36); y se lleva cabo el crecimiento preovulatorio; pese a que muchos folículos antrales se pueden desarrollar durante este periodo, solo uno será seleccionado como folículo dominante quien llegará a la ovulación, este folículo dominante, que al ir incrementando así la síntesis y producción de estrógenos, los cuales a su vez van llenando la cavidad antral y haciendo que aumente el diámetro folicular (42);(39).

Se estimula el crecimiento folicular con el desarrollo de un gran folículo y el aumento en los niveles de estradiol. Cuando los estrógenos alcanzan cierto nivel, se estimula la receptividad al macho y comienza el período de celo o estro (43).

3.3.3.2 Estro

Estro se define como el periodo de actividad y receptibilidad sexual (44).

Durante el estro, cuya duración es de 18 ± 6 h, la vaca manifiesta inquietud, ansiedad, brama con frecuencia y pierde el apetito; en el caso de las vacas lecheras, se reduce su producción (45). Las vacas presentan descarga de mucus con mínima viscosidad (filante), cuyo olor atrae y excita al toro (presencia de feromonas), edema de vulva y en el útero se produce un aumento del tono miometrial (39).

Durante esta fase, los estrógenos en altas concentraciones alcanzan el umbral de estimulación del centro cíclico hipotalámico, estimulando a las neuronas hipotalámicas a producir el pico de GnRH y en consecuencia el pico de LH. Con respecto a la FSH, disminuye su secreción, consecuencia del feed back negativo



estrogénico y de la inhibina, con excepción del momento en que se produce el pico preovulatorio de LH, en que puede aparecer un pico de FSH (36). Posteriormente, 4 a 12 horas después de la onda de LH, se incrementan la concentración basal y la amplitud de los pulsos de FSH, relacionándose esto con la primera onda de crecimiento folicular (42).

3.3.3.3 Metaestro

El metaestro es la etapa posterior al estro, tiene una duración de cuatro a cinco días. Durante esta etapa ocurre la ovulación y se desarrolla el cuerpo lúteo. Después de la ovulación se observa una depresión en el lugar ocupado por el folículo ovulatorio (depresión ovulatoria) y posteriormente se desarrolla el cuerpo hemorrágico (cuerpo lúteo en proceso de formación) (44).

Durante el metaestro, las concentraciones de progesterona comienzan a incrementarse hasta alcanzar niveles mayores de 1 ng/ml, momento a partir del cual se considera que el cuerpo lúteo llegó a la madurez. El momento en que las concentraciones de progesterona son superiores a 1 ng/ml se toma como criterio fisiológico para determinar el final del metaestro y el inicio del diestro. Un evento hormonal que se destaca en este periodo consiste en la presentación del pico pos ovulatorio de FSH, lo cual desencadena la primera oleada de desarrollo folicular. Algunas vacas presentan un sangrado conocido como sangrado metaestral (39).

3.3.3.4 Diestro

El diestro es la etapa de mayor duración del ciclo estral, de 12 a 14 días. Durante esta etapa el cuerpo lúteo mantiene su plena funcionalidad, lo que se refleja en concentraciones sanguíneas de progesterona, mayores de 1 ng/ml. Además, en esta etapa se pueden encontrar folículos de diferente tamaño debido a las oleadas foliculares (44).

El mantenimiento del cuerpo lúteo, así como la síntesis de progesterona está ligada a la hormona LH que es progesterotrófica y luteotrófica. Otras hormonas que intervendrían en la síntesis de progesterona, son la FSH y la Prostaciclina

(PGI₂). La FSH se uniría a receptores ubicados en el cuerpo lúteo y provocaría un aumento en la secreción de progesterona (36).

En lo referente a la PGI₂ además de estimular a las células luteales para producir progesterona, aumentaría el flujo sanguíneo a nivel ovárico con el efecto positivo que esto significa sobre la síntesis y secreción de progesterona. Si el huevo no es fecundado, el cuerpo lúteo permanece funcional hasta el día 15-20, después del cual comienza a regresar en preparación para un nuevo ciclo estral (36).

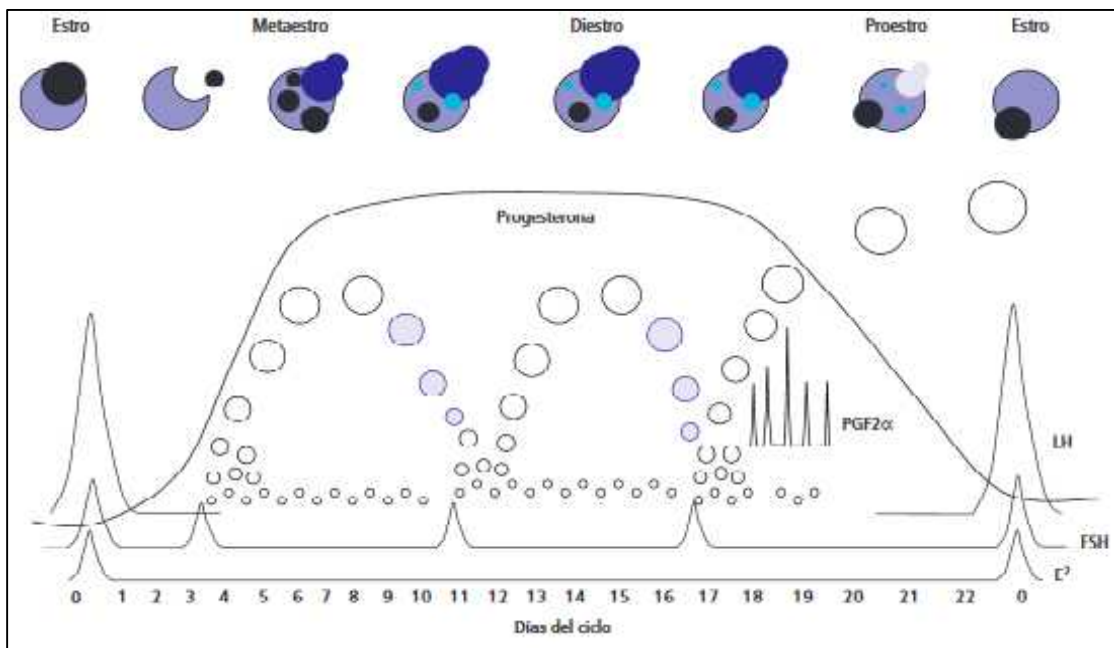


Figura 3: Etapas del ciclo estral.

Fuente: (44).



Figura 4: Etapas del ciclo estral, ovarios.

Fuente: (38).

3.4 Hormona Antimulleriana

3.4.1 Propiedades

La hormona Antimulleriana es un miembro del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), secretada esencialmente por las células de Sertoli fetales y prepuberales en los hombres (46) y en mujeres por las células de la granulosa de los folículos preantrales (primarios y secundarios) y antrales pequeños. La hormona Antimulleriana inhibe el reclutamiento de los folículos primordiales y, posteriormente, continúa la expresión en los folículos en crecimiento y desaparece cuando alcanzan un tamaño en el que pueden ser seleccionados por la FSH (47).

Además, participa en la regulación de la cantidad de folículos en crecimiento (inhibe el reclutamiento de folículos primordiales), y de esta manera se convierte en un marcador para valorar la reserva folicular (47). El gen que codifica la AMH se encuentra en el brazo corto del cromosoma 19. La acción de la AMH se ejerce a través de dos receptores: el receptor tipo I (AMHRI) y el receptor tipo II



(AMHRII) que están presentes en los órganos diana de la AMH (gónadas y conductos de Mullerian) (48).

Pasaron casi 40 años para que la proteína y el gen que la codifica fueran aislados y caracterizados; poco después, se describieron sus receptores (25).

La concentración en sangre de esta hormona se ha asociado positivamente con el recuento de folículos antrales en ratones, mujeres, ovejas y vacas (49), lo que puede ser un marcador confiable para estimar el RFA y puede ayudar a predecir la respuesta superovulatoria en el ganado. La AMH se ha considerado que cumple dos funciones principales:

- 1.) Inhibición del crecimiento de folículos primordiales evitando así un agotamiento temprano de la reserva folicular ovárica.
- 2.) Modulador folicular mediante la reducción de la capacidad de respuesta a FSH de los folículos de la zona preantral (50).

3.4.2 Hormona Antimulleriana en humanos

Las fluctuaciones en los niveles séricos de hormona Antimulleriana se ha encontrado en una serie de condiciones fisiológicas, las cuales deben tenerse en cuenta al interpretar sus valores en la práctica clínica. Existe una alta variabilidad interindividual en los niveles de la hormona Antimulleriana de acuerdo con la edad (51), debido a la diferencia en el número de folículos antrales de las mujeres de distintos grupos etarios, los cuales tienden a disminuir, especialmente después de los 40 años (52). A su vez pueden presentarse variaciones según su etnia; las mujeres afroamericanas e hispanas tienden a tener niveles más bajos de la hormona Antimulleriana que las mujeres caucásicas (53).

3.4.3 Hormona Antimulleriana en el ganado bovino

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



disminuye marcadamente cuando incrementa el tamaño del folículo, teniendo grandes concentraciones de AMH en folículos entre 3 - 7 mm y bajas concentraciones en folículos >7 mm de diámetro (49).

Se ha demostrado que las concentraciones circulantes de AMH varían fisiológicamente desde el nacimiento hasta la pubertad. En terneras Holstein se ha visto que las concentraciones de AMH aumentan durante los primeros 2 meses de edad, disminuyen a los 5 y son estables a los 8 a 9 meses de edad, aproximadamente en el momento de la primera ovulación. Un patrón similar se muestra en el ganado Maine-Anjou, con concentraciones de AMH que incrementan rápidamente entre 1 y 3 meses de edad, se mantiene a los 6 meses y decrece hasta los 12 meses de edad. Por lo tanto se ha considerado que en el ganado se incrementa la concentración de AMH en los primeros meses de vida pero produce una disminución al momento de llegar a la pubertad (16);(44).

3.4.3.1 Estudios de la AMH en bovinos

Diferentes estudios realizados en bovinos muestran la relación que tiene la AMH sobre la fertilidad.

Ireland *et al.*, (54), reportaron que la variación en el conteo de folículos antrales (RFA) durante las ondas foliculares está muy asociada con alteraciones en las concentraciones circulantes de AMH. Mencionan que el recuento de folículos antrales pueden ser marcadores fenotípicos fiables para predecir el número relativo de los folículos morfológicamente sanos y ovocitos en los ovarios, y tal vez predecir la longevidad potencial reproductiva en el ganado.

Posteriormente Jimenez *et al.*, (55), llegaron a la conclusión de que una sola determinación de la concentración de AMH en novillas lecheras jóvenes, puede ser un método de diagnóstico para predecir la longevidad del hato y que también puede ser un marcador genético útil para mejorar los sistemas de crianza y mejorar la longevidad de las vacas.



Pfeiffer *et al.*, (56), reportaron que la determinación de AMH durante el ciclo estral, no se vio influenciada por la sincronización hormonal exógena. Estos datos señalan la posibilidad de medir la AMH en cualquier momento del ciclo, sin tener que usar algún protocolo de Inseminación artificial a Tiempo Fijo (IATF).

Otro estudio entre la relación entre la AMH con la superovulación llegaron a la conclusión que esta hormona podría convertirse en un método práctico y útil para predecir la respuesta folicular y la capacidad superovulatoria de cada vaca, mejorando la eficiencia de los programas de transferencia de embriones en ovulaciones múltiples en hatos lecheros (57).

3.4.4 El papel de la AMH en el ovario

3.4.4.1 La AMH y los folículos primordiales

Durante la diferenciación sexual femenina la AMH no se expresa en el ovario. La AMH se expresa por primera vez en las células de la granulosa de los folículos primordiales, en el día 3^o o 4^o de vida postnatal en ratas, y en el feto humano a partir de la 36 semana de gestación (58). La AMH continúa expresándose en los folículos en crecimiento del ovario hasta que han alcanzado el tamaño y estadio de diferenciación, en el que serán seleccionados mediante la acción de la hormona folículo estimulante (FSH). En la rata esto ocurre en el estadio antral inicial en folículos pequeños en crecimiento (17), y en humanos en folículos antrales de 4-6 mm de tamaño (59). Por tanto, la AMH se expresa en los folículos seleccionados del pool de folículos primordiales que entrarán a ser reclutados por acción de la FSH. Antes y después de estos dos importantes puntos de regulación en el ovario, la AMH no se expresa (17).

Este patrón de expresión indica que la AMH debía tener un papel importante en la regulación del número de folículos en crecimiento y en su selección para la ovulación. Estas funciones potenciales de la AMH se investigaron utilizando modelos de ratas sin AMH (17).

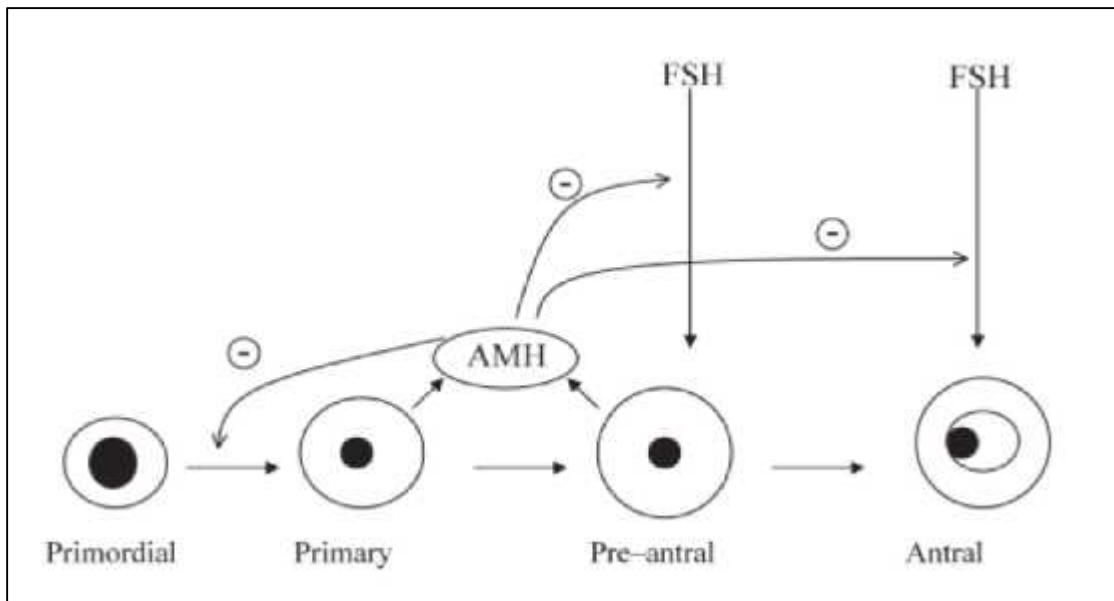


Figura 5: Rol de la AMH en la foliculogénesis.

Fuente: (60).

3.4.4.2 Correlación de AMH con RFA

Desde que se describió por primera vez la relación entre el incremento de edad y la disminución del recuento de folículos antrales (RFA), han existido múltiples intentos para establecer la relación entre la reserva ovárica y el RFA. Se asume que el número de folículos antrales originados desde la cohorte de folículos en crecimiento, también se correlaciona con el número de folículos primordiales, o la reserva ovárica (61). El RFA se define como el número de folículos <10 mm de diámetro detectados por ecografía durante la fase folicular temprana (62).

Hoy en día, el RFA y la AMH se han convertido en los pilares predictivo-diagnósticos de reserva ovárica en los tratamientos de reproducción asistida, como consecuencia de la mejora técnica y de la estandarización en sus mediciones que se ha producido en los últimos años. Ambos no solo son buenos marcadores del número de ovocitos recogidos tras la punción en los tratamientos de Fecundación *in vitro* (FIV), sino que, de manera equivalente, nos permiten



reconocer a las pacientes, predecir su respuesta ovárica e individualizar los protocolos de estimulación (62).

3.5 Ultrasonografía

La Ultrasonografía o ecografía es una técnica de diagnóstico por imagen de alta precisión para evaluar los procesos reproductivos en el bovino por el clínico veterinario (63).

Su aplicación en bovinos y equinos a partir de la década de los 80 ha sido uno de los pasos más importantes para el estudio y comprensión de los eventos normales que ocurren durante el ciclo estral y la gestación, a tal punto que es considerado por muchos investigadores como el avance más importante en la biología reproductiva desde la utilización del radioinmunoensayo (RIA) para medir valores hormonales circulantes en el animal (64).

Con el equipo de ecografía es posible diagnosticar una gestación a partir del día 20 post inseminación; sin embargo, es más práctico y tiene menos falsos negativos cuando se hace el día 30 post inseminación. El ecógrafo debe estar equipado con un transductor líneas de 5 o 7.5 MHz que se protege con un guante de palpación rectal, al que previamente se le agrega gel para que sirva de puente entre el transductor y la mucosa del recto (25).

La coordinación entre la visualización de la imagen y los movimientos realizados con la mano, así como la localización de los órganos reproductivos son de fundamental importancia. Una vez individualizado el órgano, el técnico deberá tener un conocimiento profundo de las estructuras anatómicas y de su apariencia normal para poder utilizar esta técnica con una mayor eficiencia (64).

En veterinaria los transductores más usados son de: 3.5-5 y 7.5 MHz (65) (66).

La frecuencia en que son emitidas y la longitud de las ondas son inversamente proporcionales. A medida que aumenta la frecuencia de emisión, la capacidad de diferenciar objetos a lo largo del camino recorrido por la onda (resolución



axial) aumenta, pero la onda se atenúa más rápido (disminuye su fuerza) (66) (67).

Cuanto mayor es la frecuencia del sonido del transductor, la imagen producida es más precisa y se ven estructuras más pequeñas (folículos de 2mm) (67).

Cuanto menor es la frecuencia, permite ver estructuras mayores como gestaciones avanzadas. En cuanto a la penetración del sonido, la situación es inversa. Cuanto mayor es la frecuencia (7.5 MHz) la penetración es menor (debido a que el sonido es absorbido rápidamente por tener una menor longitud de onda) y cuando menor es la frecuencia, mayor es la penetración (3.5 MHz) (63).

Para especies mayores en reproducción, se trabaja por vía transrectal con sondas lineales de 5 o 7.5 MHz. Para trabajos de recuperación de ovocitos (OPU) por punción ovárica o aspiración folicular, las más adecuadas son las lineales convexas de 5 o 7.5 MHz y se trabaja por vía transvaginal. Para especies menores se recomienda los de 3.5MHz lineales convexas o sectoriales (65).

3.5.1 Elección del equipo de ultrasonografía

La elección del equipo de ultrasonidos debe estar basada en las aplicaciones previstas. En ganado vacuno para un trabajo de campo rutinario, sería de elección un ecógrafo portátil con batería recargable, de poco peso y tamaño (63). La sonda más recomendable para la exploración rectal es la transrectal debido a su diseño impermeable al agua y porque se puede emplear tanto por vía transrectal como externamente por lo que resulta más versátil. Las sondas transrectales son generalmente lineales y son las recomendables por su manejo más sencillo frente a las sectoriales (63).

Dependiendo de la especie y del tipo de ecografía a realizar se elige una frecuencia, en vacuno se trabaja normalmente con una frecuencia de 7,5 MHz porque ofrece una buena relación entre calidad de imagen y profundidad (5 cm. aproximadamente) (65).



3.5.2 Estructuras fisiológicas visibles en el ovario por el ecógrafo

Las estructuras fisiológicas detectables en el ovario mediante ecografía son los folículos y el cuerpo lúteo. Los folículos aparecerán en la imagen como estructuras circulares de color negro (anecoicas) y que normalmente no sobresalen sobre la superficie del ovario, presentan un borde muy fino, y a veces de contorno irregular por la compresión de otras estructuras del ovario (65). Su tamaño va creciendo durante el ciclo estral de la vaca a razón de 1.5 a 2.5 mm por día, llegando el folículo dominante a 15-20 mm en el momento previo a la ovulación (65). El cuerpo lúteo se mostrara como una imagen de forma circular con una cabeza más o menos prominente sobre la superficie del ovario, y en un tono gris oscuro, en su interior se puede apreciar una pequeña cavidad con liquido o bien una banda blanca que lo atraviesas de un extremo al otro (65).

El cuerpo Lúteo (CL) se identifica a partir de 2 o 3 días después de la ovulación, y crece 1-2mm por día, hasta su máximo tamaño 7 a 12 días post -ovulación. Aparece más bien grisáceo, y muchas veces con una pequeña cavidad central con líquido y alguna trabécula visible (60-70%), y son a veces mal llamados cuerpos lúteos cavitarios (ya que no poseen efecto significativo sobre la fertilidad, ni sobre la duración del ciclo, ni en la concentración plasmática de progesterona, respecto de los no cavitarios) (68).

Este examen es útil para el control de reinicio de actividad ovárica postparto, para indicar en qué momento del ciclo se encuentra la vaca para prever los tratamientos de inducción y sincronización del celo, optimizar tratamientos de súper ovulación y diagnosticas estructuras patológicas (65).

3.5.3 Morfología ultrasonográfica del cuerpo lúteo

La ultrasonografía también ha sido usada para caracterizar el CL bovino durante el intervalo interovulatorio. Su ecotextura es diferente a la del estroma ovárico e identificable por ultrasonografía en la mayoría de las vaquillonas a partir del día de la ovulación (promedio: día 0,5) y a partir del día 3 con bordes bien definidos. Normalmente se distingue a lo largo de casi todo el ciclo estral e inclusive hasta



cerca de la siguiente ovulación (en promedio: 1,4 días antes de que la misma) (63).

En algunos casos el cuerpo albicans se distingue hasta 2 o 3 días post ovulación. Se han realizado estudios para determinar la eficiencia de la ultrasonografía en la observación y medición del CL comparado con la examinación de las mismas estructuras post mortem. Se concluyó que no hay diferencias entre las dos técnicas ya que se visualizó correctamente en todas las vaquillonas (23/23) la localización del CL en el ovario izquierdo o derecho entre los días 12 y 14 (63).



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Materiales Biológicos

- Vaquillas Holstein mestizas
- Ovarios
- Sangre

4.1.2 Materiales Químicos

- Alcohol 70%
- Kit “DL-AMH-b” de DEVELOP®
- Solución fisiológica
- Gel

4.1.3 Materiales de Laboratorio

- Ecógrafo portátil sonda lineal, frecuencia 7,5Mhz
- Centrífuga
- Balanza, calibrador, regla
- Pipetas mecánicas y Drummond
- Puntas de pipeta
- Tubos eppendorf 2ml
- Congelador
- Vaso de precipitación
- Mandil, cofia, guantes de nitrilo y ginecológicos

4.1.4 Materiales de Oficina

- Plantillas de campo
- Libreta, esferos
- Medios Extraíbles (Memory USB)
- Calculadora
- Marcadores

- Computadora

4.1.5 Materiales de Campo

- Tubos EDTA 4 ml
- Agujas vacutainer
- Cooler, gel refrigerante
- Guantes de manejo, cofia
- Frascos de orina, recipientes plásticos
- Papel secante, algodón
- Spray de colores, esferos, etiquetas
- Overol, botas, casco
- Cámara fotográfica

4.2 Métodos

4.2.1 Área de estudio



Figura 6: Ubicación del área de estudio (Azuay y Cañar).

Fuente: Directorio cartográfico de Google Maps, 2018.



4.2.1.1 Ubicación política-geográfica

El proyecto se realizó en camales ubicados en las provincias del Azuay y Cañar (región sur del Ecuador). La Provincia de Azuay está constituida por 15 cantones, 27 parroquias urbanas y 60 parroquias rurales. Posee dos zonas, el área denominada los Andes (oriental y occidental) y la zona costanera (oeste). El clima es variable desde el tropical hasta el glacial. Presenta dos estaciones definidas: húmeda y seca. En el Occidente la temperatura oscila entre los 20 °C y 33 °C, mientras que, en la zona andina, ésta suele estar entre los 10 °C y 28 °C. La provincia del Cañar tiene una superficie de 3.669 km., cuenta con 7 cantones, el clima va desde los 0°C hasta los 30°C.

4.2.2 Unidad experimental

Se analizaron 102 vaquillas Holstein mestizas, que llegaron a ser faenadas en camales de las provincias de Azuay y Cañar.

A estos animales se les realizó muestreo sanguíneo pre morten para determinar niveles de la hormona Antimulleriana (AMH). Luego de que fueron faenadas se recuperaron los dos ovarios para determinar el recuento de folículos antrales (RFA) y la morfología del ovario expresada en tamaño y peso del ovario y cuerpo lúteo.

4.2.2.1 Criterios de inclusión

- Vaquillas de raza Holstein mestizas.
- Que provengan de ganaderías sobre los 2.500msnm.
- Que hubieran estado en un sistema de alimentación al pastoreo.
- Animales no gestantes.
- Condición corporal 2,5 - 3 escala de 1 - 5.
- Valoradas como sanas por los técnicos encargados de los centros de faenamiento.



4.2.2.2 Criterios de exclusión

- Vaquillas que sean determinadas por el técnico encargado como decomisadas.
- Vaquillas con ovarios acíclicos.

4.2.3 Metodología para la Investigación

4.2.3.1 Selección de vaquillas

En primera instancia se seleccionaron de todos los animales que llegaron al camal, aquellas vaquillas que cumplieron con los criterios de inclusión descritos anteriormente, una vez seleccionadas mediante la utilización de spray de diferentes colores fueron identificados los animales en el patio de espera (pre-faenamiento).

4.2.3.2 Toma de muestras de sangre

Las muestras fueron tomadas por duplicado pre-morten en el patio de espera para el faenamiento, para lo cual se realizó venopunción coccígea, se colectó en tubos vacutainer con EDTA 4ml de sangre, se identificaron las muestras con los respectivos datos de cada animal y se colocaron en un cooler con gel refrigerante para ser transportadas al laboratorio a temperatura de 5°C en un lapso de tiempo no mayor a cuatro horas.

4.2.3.3 Recolección de ovarios

Se realizó el seguimiento de cada animal y una vez faenadas las vaquillas, se obtuvieron los ovarios en el proceso de evisceración, en donde se colocó a cada ovario (OI y OD) en frascos estériles individuales, estos contenían solución salina atemperada a 35°C. Una vez terminada la recolección, los frascos fueron colocados en un cooler y transportados al laboratorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias para su valoración, en un tiempo no mayor a cuatro horas.



4.2.3.4 Preparación de ovarios para el recuento folicular (RFA)

En el laboratorio se realizó una limpieza de todos los tejidos adyacentes a los ovarios. A continuación, se lavaron los ovarios en solución salina atemperada a 35°C hasta que estén completamente limpios.

4.2.3.5 Valoración del número de folículos antrales por ultrasonografía

Para la determinación del número de folículos antrales existentes en cada ovario se utilizó un ecógrafo portátil (Prosuond 2), con sonda lineal, 7,5Mhz. Mediante la técnica de barrido cráneo-ventral y latero-medial, ovario derecho y luego el izquierdo por separado se realizó el conteo folicular en cada ovario. Se separó en dos grupos los folículos antrales observados; los folículos <4mm fueron contados y registrados en la plantilla de campo, los folículos ≥ 4 fueron medidos (ancho y largo) y posteriormente registrados en la plantilla de campo. Esta valoración fue ejecutada por el mismo técnico siempre pos-mortem.

4.2.3.6 Valoración del número de folículos antrales por inspección directa

Una vez terminado la valoración ecográfica de los dos ovarios de cada animal, estos fueron retornados a sus respectivos frascos y pasados a otro técnico que desconocía de los resultados ecográficos, para que realice la valoración visual del número de folículos antrales existentes en cada ovario. Usando la misma metodología de agrupamiento los folículos <4mm fueron identificados contados y registrados en la plantilla de campo y los folículos ≥ 4mm fueron medidos (ancho y largo), esta medición se realizó en forma directa con ayuda de una regla y un calibrador (mm), por una sola persona previamente capacitada. Los datos fueron registrados en la plantilla de campo.

4.2.3.7 Determinación del peso y tamaño del ovario y cuerpo lúteo

Cada ovario fue pesado en una balanza de precisión (g) y luego medido su largo y ancho, con un calibrador (mm).

Para la valoración del cuerpo lúteo (CL), se realizó la enucleación de este con la finalidad de poder realizar el pesaje y así mismo la toma de medidas (ancho y largo) en forma adecuada.

4.2.3.8 Determinación del estadio del ciclo estral en el cual fueron obtenidos los ovarios

Para establecer la fase del ciclo estral en el cual se encontraban las vaquillas al momento de su faenamamiento, utilizó como referente el tamaño de cuerpo lúteo de acuerdo a los parámetros establecidos por Ayala *et al.* (69).

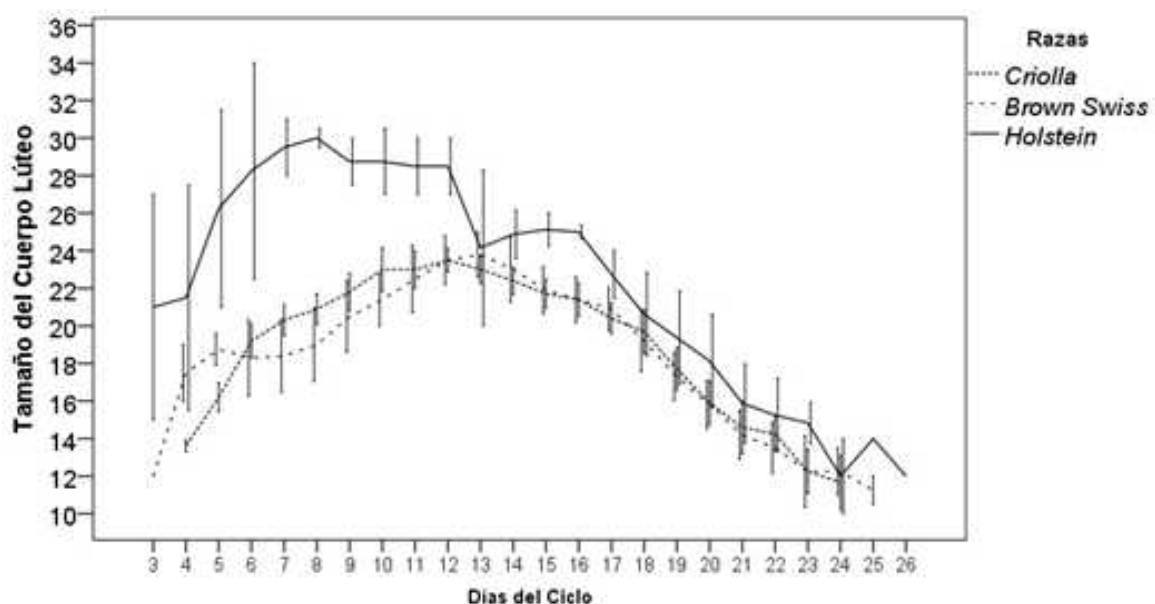


Figura 7: Tamaño del cuerpo lúteo durante el ciclo estral de vaquillas Holstein, Brown Swiss y Criollas

Fuente: Ayala *et al.* (69).



Para determinar la fase de la onda folicular se valoró las características número y tamaño de cada uno de los folículos presentes en los dos ovarios, en base a los criterios emitidos por Ginther, (70) sobre el tamaño y número de folículos presentes en cada una de las fases de la onda folicular.

Finalmente, la conjetura del número de onda folicular en el cual se encontraba el animal al ser sacrificada se estableció al conjugar los datos del tamaño del CL (fase del ciclo estral), número y tamaño de folículos antrales presente en los dos ovarios (fase de la onda folicular), lo cual nos permitió inferir si se encontraba el animal en 1, 2 o 3 onda folicular, de acuerdo a los parámetros descritos por Ayala *et al.*, (71).

4.2.3.9 Determinación de la concentración sérica de la Hormona Antimulleriana (AMH)

Las muestras de sangre fueron centrifugados a 3000 rpm durante 20 minutos. El plasma obtenido fue congelado a -20°C, hasta su posterior análisis.

La concentración de AMH fue determinada mediante una prueba de ELISA tipo sándwich, con el kit DL-AMH-b (Develop®), midiendo la intensidad del color mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 450 nm, estableciendo la concentración de AMH por comparación de la densidad óptica de las muestras con la curva estándar. El kit tiene una sensibilidad inferior a 0,117 ng/ml. Precisión intra ensayo: CV< 10% e inter ensayo: CV<12%.

4.3 Diseño experimental

El trabajo fue de tipo descriptivo, se valoraron los niveles de AMH de vaquillas de raza Holstein mestizas previo a su faenamiento y se realizó el recuento de folículos antrales presentes en los dos ovarios pos mortem, así como la valoración ecográfica y directa (visual) de las estructuras ováricas de cada una de las vaquillas en estudio.

En una segunda instancia con los valores obtenidos anteriormente se realizaron 2 grupos de animales con valores altos y bajos de AMH, basados en el valor medio de AMH de los 102 animales.



Finalmente, en base a los grupos de alta y baja concentración de AMH se buscaron relaciones con el RFA, peso, tamaño del ovario y cuerpo lúteo, así como, cual es la fase del ciclo estral, fase de la onda folicular y el número de onda.

4.3.1 Análisis estadístico

Los datos fueron tabulados en Excel y el análisis estadístico se realizó en el programa estadístico SPSS® versión 25.

Se establecieron estadígrafos principales de los valores de AMH, peso, tamaño del ovario y del cuerpo lúteo del total de los animales en estudio (n=102).

Para determinar los grupos de alta y baja concentración se utilizó el valor medio como punto de corte. Se utilizó la prueba T de Student para comparar las medias de los dos grupos respecto a las variables en estudio.

El análisis de la fase del ciclo estral, onda folicular y número de onda se utilizó un ANOVA y para comparar medias la prueba de Tukey al 5%.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Niveles de la hormona Antimulleriana (AMH), valorado pre-mortem

En primera instancia se estableció el valor promedio y error estándar ($0,08 \pm 0,006$ ng/ml) de la AMH en las vaquillas en estudio, con un rango entre 0,03 a 0,62 ng/ml, resultado que se obtuvo al valorar el plasma de las muestras de sangre tomadas en un momento desconocido del ciclo estral (pre-faenamiento de los animales en estudio).

El valor promedio ($0,08 \pm 0,006$ ng/ml) obtenido en el presente trabajo es muy inferior al descrito por Guerreiro *et al.* (72), quienes establecieron una media de $0,3 \pm 0,03$ ng/ml. La diferencia en los valores promedios de AMH entre estos dos trabajos podría ser explicado: en primer lugar por el momento de la toma de la muestra de sangre para valorar la AMH; así Guerreiro *et al.* (72), tomaron la muestra una vez terminada cada maniobra de OPU, por lo tanto, todas las vaquillas se encontraban en un momento determinado del ciclo estral, ya que cada sesión de OPU genera un reinicio de la onda folicular. En contraposición en el presente estudio las muestras de sangre fueron tomadas antes de que las vaquillas fueran faenadas (en el patio de pre-faenamiento), por lo que el momento del ciclo estral de los 102 animales fue diferente y lógicamente desconocido por nosotros en ese momento.

En este contexto, se ha demostrado por parte de Gobikrushanth *et al.* (73), que los niveles de AMH determinados en un momento conocido del ciclo estral (reinicio de la onda folicular) a un grupo de bovinos ($218,7 \pm 14,5$ pg./ml = $0,218$ ng/ml), difiere ($P < 0,05$) al encontrado en este mismo conjunto de animales, cuando cada uno de estos se encontraban en diferentes momentos del ciclo estral ($187,3 \pm 13,1$ pg./ml = $0,187$ ng/ml). Además, en este trabajo se puede observar que los niveles de AMH descritos en el reinicio de la onda folicular son el doble de los establecidos en un momento desconocido del ciclo estral, lo cual fortalece nuestra primera argumentación antes indicada.



Un segundo criterio con el cual se justifica la diferencia en los valores promedios de AMH, es el hecho de que Guerreiro *et al.* (72), evaluaron vaquillas Holstein criadas en el trópico bajo (Sao Paulo Brasil) y nosotros valoramos vaquillas Holstein procedentes de ganaderías ubicadas sobre los 2500msnm (trópico alto), es decir, los animales de los dos estudios se encontraban en condiciones medioambientales, de manejo y alimentación diferentes. Y a decir de autores como Tovío (74); Sartori *et al.*, (75), la alimentación y otros factores medioambientales pueden llegar a alterar la función ovárica. Criterio que es compartido y fortalecido por Ayala *et al.* (71), quienes indican que las condiciones medioambientales, nutricionales, raciales y de manejo del trópico alto afectan la fisiología ovárica de las vaquillas Holstein mestizas de la región centro sur del Ecuador.

Finalmente, el kit de Elisa empleado para determinar la AMH en los dos estudios fue diferente: Guerreiro *et al.*, (72), utilizaron Bovine AMH enzyme-linked immunosorbent assay AL-114 kit (Ansh Labs, USA) y en nuestro trabajo se utilizó kit de ELISA tipo sándwich, DL-AMH-b (Develop®), China.

5.2 Recuento Folículos Antrales (RFA), realizado en forma visual y ecográfica en ovarios colectados pos-mortem

Luego de la toma de muestras de sangre pre-mortem, las vaquillas fueron faenadas y sus dos ovarios recuperados, identificados, para luego realizarse el recuento de folículos antrales (RFA) por dos técnicas: visual directa y ecográfica.

Para ejecutar el RFA, estos fueron divididos en dos grupos: en el primero se ubicaron los folículos antrales <4mm y en el segundo los folículos antrales >4mm.

5.2.1 Recuento Folículos Antrales (RFA) <4mm, realizado en forma visual directa y ecográfica

Al realizar el RFA <4mm en forma visual directa se determinó un promedio y error estándar de $26,96 \pm 1,74$ folículos, con valores mínimos y máximos de 0,00 y 99,00 respectivamente. Sin embargo, al ejecutar la valoración ecográfica de este



grupo de folículos (<4mm) se estableció un promedio y error menor ($16,11 \pm 0,87$ folículos), con un rango de 0,00 a 53,00 folículos, mostrando diferencia estadística entre las dos técnicas ($P < 0,05$). Estos resultados demuestran que el RFA realizado a folículos <4mm es menos efectivo por ultrasonografía (40, 24%), que la valoración mediante la técnica visual directa.

Esta variación en el porcentaje de efectividad está directamente relacionado a la resolución del ecógrafo, ya que conceptualmente un equipo con una resolución de 3mm, por ejemplo, permitirá distinguir dos interfases separadas por 3mm como dos estructuras diferentes; sin embargo, si la distancia que separa a las dos interfaces es menor a 2mm, esta se observará como una sola estructura Diéz, (76).

Si bien no se ha encontrado trabajos en bovinos que relacionen la eficiencia de la técnica valoración ecográfica vs valoración visual directa en la cantidad de folículos menores a 4mm, hay trabajos como el realizado por Alanusa *et al.*, (77), quienes valoran la efectividad del diagnóstico de gestación mediante ecografía y palpación rectal, llegando a concluir que la concordancia entre estas dos técnicas es del 67,6%, porcentaje similar a los encontrados en el presente trabajo, (**Tabla 1**).

5.2.2 Recuento Folículos Antrales (RFA) >4mm, realizado en forma visual directa y ecográfica

Al comparar el promedio y error estándar de folículos antrales >4mm observados mediante ecografía ($6,58 \pm 0,30$ folículos) vs observación directa ($6,27 \pm 0,35$ folículos) se pudo determinar que no existió diferencia estadística ($P > 0,05$). La similitud de resultados corrobora lo analizado en el acápite anterior donde se indicó que la resolución del ecógrafo juega un papel importante en la valoración del número de folículos.

**Tabla 1:** Valores descriptivos de los niveles de Hormona Antimulleriana (AMH), el Recuento Visual y ecográfico de los Folículos Antrales (RFA).

Variable	N	\bar{X}	DE	Valores		Cuartiles		
				Mínimo	Máximo	25%	50%	75%
<i>Hormona Antimulleriana (AMH)</i>	102	0,08	0,07	0,03	0,62	0,05	0,06	0,09
<i>Recuento Visual de folículos <4mm (RFA)</i>	102	26,96	17,54	0,00	99,00	14,75	25,50	35,00
<i>Recuento Ecográfico de folículos <4mm (RFA)</i>	102	16,11	8,81	0,00	53,00	10,00	15,50	22,00
<i>Recuento Visual de folículos >4mm (RFA)</i>	102	6,27	3,55	0,00	17,00	4,00	6,00	8,00
<i>Recuento Ecográfico de folículos >4mm (RFA)</i>	102	6,58	3,07	1,00	17,00	5,00	6,00	8,75

N=número de casos. \bar{X} =media del valor. DE=desviación estándar.

Fuente: Autoras

5.3 Resultados de AMH en grupos de alta y baja concentración

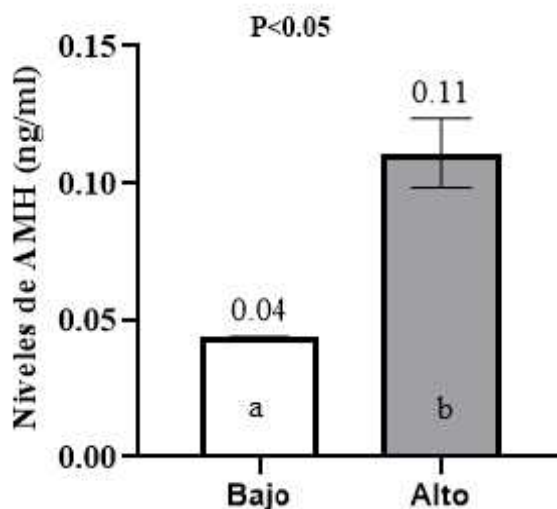
Para el análisis de relación entre RFA y concentraciones de AMH, a los animales en estudio se les agrupo en vaquillas con alto (n=50) y bajo (n=52) nivel de hormona Antimulleriana, considerando como punto de corte el valor promedio de AMH obtenido a nivel general (0,08ng/ml).

Para comparar los valores promedios y error estándar entre grupos de alto y bajo nivel de AMH, se ejecutó la prueba de T de Student, obteniendo promedios de $0,11 \pm 0,013$ ng/ml (alto) y en el grupo de bajo ($0,04 \pm 0,001$ ng/ml), con diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los grupos. **(Fig. 8).**



Los valores determinados para los grupos de alto y bajo nivel de AMH en el presente trabajo mantienen similar tendencia que los descritos por Souza *et al.*, (78), quienes realizaron una clasificación de los animales utilizados en su ensayo similar al propuesto por nosotros, basados en el nivel de concentración de la AMH y determinaron dos grupos en su trabajo: el primero vacas con bajo nivel de AMH (44,9 pg/ml = a 0,045 ng/ml) y alto nivel (243,1 pg/ml = a 0,243 ng/ml), se puede observar que el grupo considerado de bajo nivel de AMH en los dos trabajos son similares; sin embargo, el grupo clasificado como alto en el experimento de Souza *et al.*, (78) presentaron el doble de AMH respecto al mismo grupo del presente estudio, esta diferencia exclusivamente en el grupo de alta concentración de AMH podría ser explicado por las condiciones de mantenimiento (intensivo vs extensivo), alimentación (dieta concentrada vs pastoreo) y la edad de los animales (primíparas vs múltiparas) utilizados en los dos experimentos. Además, del kit utilizado para la determinación de la AMH (MofA Global using a bovine AMH ELISA, en el trabajo de Souza *et al.*), el cual brinda resultados en pg/ml, mientras que el kit de ELISA tipo sándwich, DL-AMH-b (Develop®), China utilizado en el presente estudio se describe en ng/ml.

Es importante resaltar que aun trabajando con un mismo kit para determinar los niveles de AMH, los resultados obtenidos en varios estudios son diferentes; así Batista *et al.*, (14), establecieron valores de $0,06 \pm 0,02$ ng/ml para el grupo clasificado por ellos como de baja concentración de AMH y $0,57 \pm 0,26$ ng/ml (alto); sin embargo, Guerreiro *et al.*, (72), determinaron valores de $0,2 \pm 0,01$ ng/ml (bajo) y alto $0,4 \pm 0,02$ ng/ml y como Baldrighi *et al.*, (13), establecieron valores de $0,13 \pm 0,02$ ng/ml (bajo), $0,54 \pm 0,11$ ng/ml (alto), los tres utilizaron el mismo kit de Ansh Labs, Webster, TX, USA, pero el momento de la toma de muestras fue diferente para la valoración de la AMH, lo cual proporcionó resultados diferentes.



Prueba de T de Student ab= indican diferencia estadística entre grupos.

Figura 8: Valores promedios de la Hormona Antimulleriana (AMH), en los grupos clasificados como de bajo y alto nivel de AMH, valorado pre-mortem.

Fuente: Autoras

5.4 Relación de recuento de folículos antrales (RFA) <math>< 4\text{mm}</math> y $> 4\text{mm}$, con los grupos clasificados como de bajo y alto nivel de AMH, mediante las técnicas de ecografía y conteo directo (visual)

En nuestro estudio el RFA fue realizado en un momento desconocido del ciclo estral de las vaquillas, una vez que estas fueron faenadas, directamente en los ovarios recuperados pos-mortem. La valoración del RFA se ejecutó mediante ultrasonografía y luego por inspección visual directa de los folículos antrales presente en la parte superficial de los dos ovarios.

5.4.1 Relación del RFA <math>< 4\text{mm}</math> por el método Ecográfico con el grupo de bajo y alto nivel de AMH

Al clasificar a las vaquillas en grupos de alto y bajo nivel de AMH, se determinaron un promedio y error estándar de $20,94 \pm 1,14$ folículos (alto) y bajo



de $11,46 \pm 0,95$ folículos, con diferencia ($P < 0,05$) entre grupos (**Fig. 9**). Además, se observó una correlación positiva y altamente significativa entre el RFA y AMH de $r = 0,56$; $P < 0,001$.

El número de folículos descrito en el presente trabajo para el grupo de bajo y alto nivel de AMH, fueron similares a los determinados por Guerreiro *et al.* (72), quienes establecieron que los grupos de bajo y alto nivel de AMH presentaron $13,6 \pm 0,9$ folículos y $20,9 \pm 1,5$ folículos respectivamente. Con una correlación positiva y altamente significativa entre el RFA y la concentración de AMH ($r = 0,84$; $P < 0,001$).

Otros autores como Batista *et al.*, (14), al trabajar con vaquillas Holstein si bien establecieron valores similares para el grupo clasificado como de bajo nivel de AMH ($13,4 \pm 1,40$ folículos; grupo bajo); sin embargo, el número de folículos promedio establecido para el grupo (alto) en el presente trabajo está por debajo del valor descrito por Batista *et al.*, ($34,3 \pm 3,12$ folículos; grupo alto). Se considera que la variación en el grupo clasificado como de alto contenido de AMH en los dos trabajos estaría relacionado con el tipo de alimentación (concentrado vs pastoreo), el sistema de manejo (intensivo vs extensivo) y el piso altitudinal (trópico bajo vs trópico alto). Además, en los dos trabajos se determinaron correlaciones positivas y altamente significativas entre RFA y concentración de AMH.

5.4.2 Relación del RFA $>4\text{mm}$ por el método Ecográfico con el grupo de bajo y alto nivel de AMH

Se observó un promedio de $7,36 \pm 0,47$ folículos en el grupo clasificado como de alto valor de AMH, y $5,83 \pm 0,37$ folículos (bajo) nivel de AMH (**Fig. 9**), sin diferencia estadística ($P > 0,05$) entre grupos. No se encontró correlación entre la AMH y RFA mayores a 4mm ($r = 0,14$; $P > 0,17$).

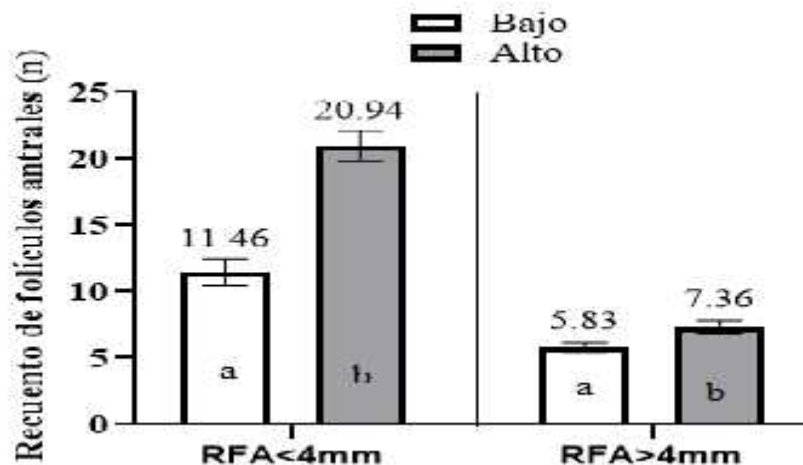
Si bien autores como Guerreiro *et al.* (72) y Batista *et al.*, (14), establecieron que existe correlación entre el RFA y la concentración de AMH (descrito en el punto anterior), esta correlación (RFA con AMH), se dio exclusivamente entre el RFA



<4mm y la AMH, sin embargo, al valorar el RFA >4mm y la AMH en un momento indeterminado del ciclo estral no presentó correlación.

Estos resultados podrían ser explicados por los conceptos establecidos por Ginther, (70), quien determina que cada onda folicular se inicia con la fase de reclutamiento donde los folículos tienen un diámetro <4mm, luego pasan a la fase de selección (5-6mm) y finalizan en dominancia (>10mm). Además, si bien el número de folículos antrales reclutados es repetible en cada animal, no es menos cierto que la variabilidad RFA es alta entre animales (reclutamiento); sin embargo, al tratarse al bovino de una especie monótona al pasar los folículos de reclutamiento a selección y dominancia se reducen comúnmente a un folículo con capacidad de desarrollo y los demás se atresian. Por lo tanto, únicamente en la fase de reclutamiento se expresaría realmente la relación de la cantidad de RFA y la AMH, sin embargo, en las siguientes fases (selección y dominancia), esta variabilidad en el RFA se reduciría entre animales dando como consecuencia valores de correlación distintos con la AMH.

Esta conjetura es fortalecida por lo descrito en otros mamíferos como los roedores, en los cuales se describió que la expresión de AMH comienza en los folículos pre-antrales (folículos primarios tempranos), alcanza su punto máximo en los folículos antrales tempranos y luego disminuye hasta desaparecer en los folículos pre-ovulatorios Durlinger *et al.* (17). Además, en los macacos se determinó que los niveles de AMH disminuyen para que pueda seleccionarse el futuro folículo dominante Xu *et al.* (79) .



Prueba de T de Student ab=diferencia estadística entre grupos.

Figura 9: Valores promedios y error estándar del recuento mediante ecografía de los folículos antrales <4mm (RFA<4mm) y de los folículos antrales >4mm (RFA>4mm), en los grupos clasificados como de bajo (blanco) y alto nivel de AMH (plomo).

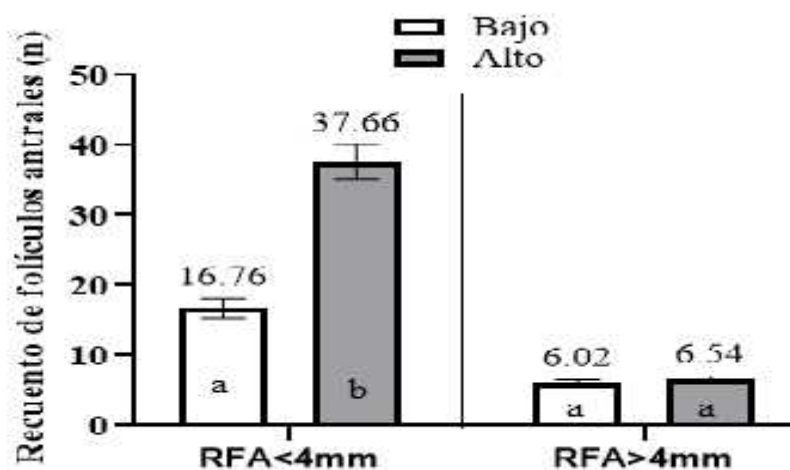
Fuente: Autoras

5.5 Valoración del RFA <4mm y >4mm por el método visual con el grupo de bajo y alto nivel de AMH

Al realizar el RFA <4mm que se visualizaban directamente en la superficie de los ovarios que fueron recuperados pos-mortem se determinó, un promedio de $16,76 \pm 1,34$ folículos en el grupo de vaquillas clasificadas como de bajo y $37,66 \pm 2,48$ folículos (alto) nivel de AMH, con diferencia estadística ($P < 0,05$) entre grupos. **(Fig. 10)**. Con un valor de correlación positiva y altamente significativo ($r = 0,63$; $P < 0,001$) entre estas dos variables.

Sin embargo, al ejecutar el RFA de folículos >4mm en el presente trabajo, se determinó un promedio de $6,02 \pm 0,49$ folículos (bajo) y $6,54 \pm 0,5$ folículos (alto) nivel de AMH, sin encontrar diferencia estadística ($P > 0,05$) entre grupos (Fig. 3), sin correlación entre RFA>4mm y la AMH ($r = 0,05$; $P > 0,17$).

Para la discusión tomaremos como referencia el trabajo de Silva *et al.* (80), ya que ellos realizan valoración visual (en microscopio) de los folículos antrales, pero de muestras histológicas previamente preparadas, llegando a determinar un promedio superior al del presente trabajo (552 ± 7 folículos) en el grupo clasificado por ellos como de alto y 111 ± 3 folículos (bajo), nivel de AMH. Si bien la diferencia numérica en los grupos de alto y bajo nivel de AMH de los dos trabajos es muy grande, esto es explicado por la metodología utilizada (cortes histológicos vs recuento superficial directo en ovarios), al estado zootécnico (vacas vs vaquillas) y la raza evaluada (Angus vs Holstein). Sin embargo, la tendencia a presentar mayor número de folículos en el grupo alto nivel de AMH es similar en los dos grupos.



Prueba de T de Student ab=diferencia estadística entre grupos en cada grupo.

Figura 10: Valores promedios y error estándar del recuento visual de los folículos antrales <4mm (RFA<4mm) y el recuento visual de los folículos antrales >4mm (RFA>4mm), en los grupos clasificados como de bajo (blanco) y alto nivel de AMH (plomo).

Fuente: Autoras



5.6 Valores promedios de la morfología del ovario (OD y OI), cuerpo lúteo (CLI y CLD) de las 102 vaquillas en estudio

5.6.1 Peso promedio y error estándar de los ovarios derecho (OD) e izquierdo (OI)

Se determinó el peso de los ovarios derecho (OD) e izquierdo (OI), por separado de las 102 vaquillas que ingresaron al estudio y se expresó en gramos (g). Llegando a establecer que los ovarios derechos presentaron pesos entre 2,40g y 21,9g, con un valor promedio y error estándar de $8,23 \pm 0,38g$. los rangos de peso de los ovarios izquierdos estuvieron entre 1,10g y 13,30g, con un valor promedio de $5,02 \pm 0,24g$, (**tabla 2**).

Los resultados obtenidos en el presente estudio son menores a los establecidos por Astudillo *et al.* (81), quienes describen un peso promedio de 6,89g (OI) y de 9,62g (OD); sin embargo, se debe considerar que ellos valoraron ovarios de animales y edades desconocidas. Pesos similares a los descritos por González *et al.* (82), quienes valoraron ovarios de vacas cebús recuperados de camal, estableciendo un peso promedio de $10,1 \pm 4,4g$ (OD) y $6,3 \pm 3,8g$ (OI),

Esta pequeña diferencia existente entre los estudios de Astudillo *et al.*, González *et al.*, y el nuestro, podría ser explicada por los conceptos emitidos por Arthur *et al.* (85), quienes mencionaron que los ovarios de las vacas multíparas no difieren mucho de los de la novilla o vaca primípara; sin embargo, el peso es mayor en las vacas debido en gran parte a la progresiva deposición de tejido cicatrizal como resultado de su prolongada funcionalidad.

5.6.2 Peso promedio y error estándar del cuerpo Lúteo

Al determinar la presencia de cuerpo lúteo en uno de los dos ovarios de las vaquillas en estudio se determinó la existencia de esta estructura en el 87,25% (89/102) de los animales. Con un peso que fluctuaba entre 0,20g y 9,20g, con un peso promedio de $3,38 \pm 2,22g$, (**tabla 2**).



El porcentaje de animales sin presencia de CL en el presente trabajo fue del (12,75%), valores que concuerdan con lo establecido por Eroles *et al.* (83) quienes describieron que el 11,73% de los animales no evidenciaron la presencia de CL. Sin embargo, hay autores como Souza *et al.* (84), describen que el 9,3% de las hembras analizadas por ellos no presentaron CL en los ovarios. Estos valores difieren a los obtenidos en la presente investigación, seguramente como consecuencia del tipo de animal (*Bos indicus*) y el lugar de procedencia de los mismos (trópico bajo), a diferencia de los animales del presente trabajo (raza Holstein mestizas), criadas sobre los 2500msnm.

El peso promedio del CL determinado en el estudio es mayor al descrito por González *et al.* (82), quienes mencionan un valor promedio de $2,5 \pm 1,2g$, la diferencia de valores podría estar explicada por la raza de animales utilizadas en cada estudio, así González *et al.*, trabajaron con ovarios procedentes de vacas de raza Cebú y nosotros con Holstein mestiza.



Tabla 2: Valores promedios del peso de los ovarios derecho e izquierdo, así como, del cuerpo lúteo de las 102 vaquillas en estudio.

Variable	N	\bar{X}	DE	Valores		Cuartiles		
				Mínimo	Máximo	25%	50%	75%
<i>Peso del ovario derecho (g)</i>	102	8,23	3,80	2,40	21,90	5,38	7,50	10,30
<i>Peso del ovario izquierdo (g)</i>	102	5,02	2,40	1,10	13,30	3,40	4,50	6,00
<i>Peso cuerpo lúteo OD (g)</i>	88	3,38	2,10	0,20	9,20	1,53	3,65	4,75
<i>Peso cuerpo lúteo OI (g)</i>	1	1,70	0,00	-	-	-	-	-

N=número de casos. \bar{X} =media del valor. DE=desviación estándar.

Fuente: Autoras

5.6.3 Tamaño promedio y error estándar de los ovarios derecho (OD) e izquierdo (OI)

Se estableció el tamaño de ambos ovarios de las 102 vaquillas; el promedio y el error estándar del ovario derecho (OD) $22,91 \pm 0,42$ mm con un rango entre 15,00 a 34,5mm y de $20,00 \pm 0,36$ mm (OI), con valores entre 12,5 y 31,00mm, (**tabla 3**). Los tamaños obtenidos concuerdan con los descritos por Soto *et al.* (85), quienes establecieron un tamaño promedio del OD de 24,2mm y de 20,10mm (OI), en novillas tipo Sinovey.



5.6.4 Tamaño promedio y error estándar del cuerpo lúteo (CL)

Se determinó un tamaño promedio y error estándar de cuerpo lúteo de $(14,69 \pm 0,47\text{mm})$, con un rango entre 5 y 27mm, (**tabla 3**). Es importante mencionar que el momento que las vaquillas utilizadas en el estudio fueron faenadas se encontraban en momentos distintos del ciclo estral, por lo tanto, es complejo comparar trabajos que analicen el tamaño del CL en estas circunstancias. Sin embargo, existe información como la descrita por Ayala *et al.* (69), quienes al evaluar el tamaño del CL a los días 6 y 12 pos-ovulación en vaquillas Holstein, establecieron un tamaño de $16,9 \pm 0,98\text{mm}$ y $24,2 \pm 1,15\text{mm}$ respectivamente. Este mismo grupo de investigación al evaluar la dinámica folicular de vaquillas criollas criadas en sistemas de pastoreo, sobre los 2500msnm, establecieron un rango del tamaño del CL entre $12,3 \pm 0,25\text{mm}$ y $23,5 \pm 0,61\text{mm}$ Ayala *et al.* (71).

Tabla 3: Valores promedios del tamaño de los ovarios derecho e izquierdo, así como, del cuerpo lúteo de las 102 vaquillas en estudio.

Variable	N	\bar{X}	DE	Valores		Cuartiles		
				Mínimo	Máximo	25%	50%	75%
Tamaño del ovario derecho (mm)	102	22,91	4,26	15,00	34,50	19,50	22,25	25,63
Tamaño del ovario izquierdo (mm)	102	20,00	3,66	12,50	31,00	17,50	19,50	22,50
Tamaño cuerpo lúteo OD (mm)	87	14,69	4,34	5,00	27,00	12,50	15,00	17,50
Tamaño cuerpo lúteo OI (mm)	1	10,00	0,00	-	-	-	-	-

N=número de casos. \bar{X} =media del valor. DE=desviación estándar.

Fuente: Autoras



5.7 Resultados entre los grupos de vaquillas clasificadas con altos y bajos niveles de AMH y su relación con el tamaño y peso de los ovarios, así como del cuerpo lúteo

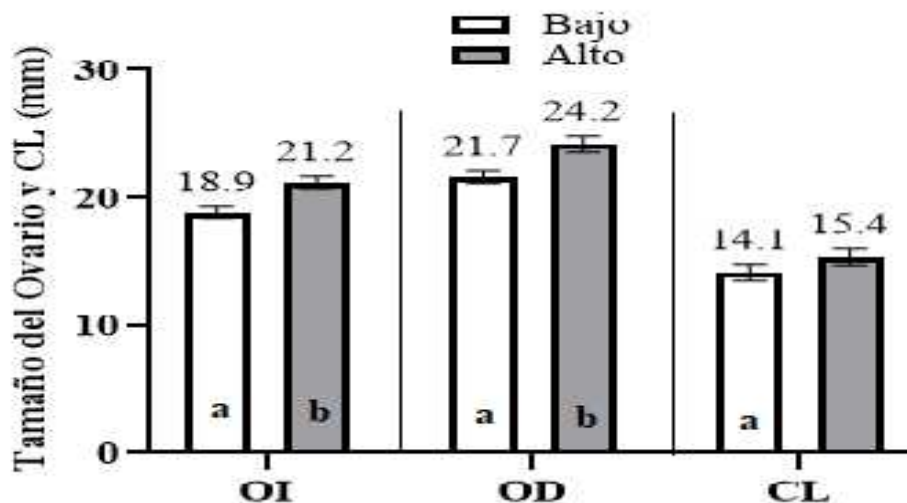
5.7.1 Tamaño promedio y error estándar de los ovarios (OD; OI) y del cuerpo lúteo (CL)

Al analizar la relación entre tamaño de los ovarios derecho (OD) e izquierdo (OI) en el grupo de vacas clasificadas con alto y bajo nivel de hormona Antimulleriana (AMH), se determinó que el tamaño y error estándar del ovario derecho ($24,2 \pm 0,67\text{mm}$) fue mayor en el grupo alto, en comparación con el grupo de bajo ($21,7 \pm 0,47\text{mm}$), con diferencia estadística entre grupos ($P < 0,05$). Igual tendencia se observó en el ovario izquierdo grupo alto ($21,2 \pm 0,53\text{mm}$) y grupo bajo ($18,9 \pm 0,44\text{mm}$), con diferencia entre grupos ($P < 0,05$). **Fig. 11.**

Los trabajos que relacionan el tamaño del ovario con la cantidad de hormona Antimulleriana, lo realizan considerando un valor único para los dos ovarios como es el caso de Ireland *et al.* (54), quienes describen que las vaquillas con alto nivel de AMH presentaban un tamaño promedio de 21,9mm, a diferencia de las del grupo de bajo nivel (17,8mm), con diferencia estadística entre grupos ($P < 0,05$). Si bien no se puede realizar una comparación efectiva de esta variable, por la metodología diferente utilizada en el estudio de Ireland *et al.*, y el nuestro, la tendencia a que en el grupo de alto nivel de AMH existan mayor tamaño del ovario vs el grupo de bajo nivel de AMH, en los dos estudios es similar. Concepto que concuerda con lo establecido por Morotti *et al.* (86), al determinar un tamaño promedio de ovario $28,3 \pm 3,9\text{mm}$ (alto) y $20,5 \pm 3,2\text{mm}$ (bajo), con diferencia estadística entre grupos. La tendencia descrita en los trabajos anteriores es observada también en el trabajo de Martínez *et al.* (87), quienes establecen que en el grupo de alto nivel de AMH hay ovarios con mayor área ($535,6 \pm 15,6$) vs el grupo de bajo nivel ($430,4 \pm 11,3$).

Sin embargo, cuando se comparó el tamaño del cuerpo lúteo en los grupos alto ($15,4 \pm 0,64\text{mm}$) y bajo ($14,1 \pm 0,66\text{mm}$) nivel de AMH en el presente trabajo, se observó valores similares ($P > 0,05$) en los dos grupos. **(Fig. 11).** Si bien los

valores promedios del tamaño del CL, determinados por Morotti *et al.* (86), son más altos ($18,2 \pm 3,1\text{mm}$) grupo de alto ($19,4 \pm 1,7\text{mm}$) y grupo de bajo nivel de AMH, comparado con los del presente estudio. La tendencia de que los CL del grupo de alto sean más grandes que los del grupo de bajo nivel de AMH es similar en los dos estudios. La diferencia de tamaños de los CL en los dos estudios podría explicarse por las razas diferentes utilizadas (Nelore vs Holstein mestizas), el estado zootécnico (vacas vs vaquillas) y el piso altitudinal (trópico bajo vs. trópico alto) respectivamente.



Prueba de T de Student ab=diferencia estadística entre grupos en cada grupo.

Figura 11: Comparación del tamaño promedio de los ovarios derecho (OD) e izquierdo (OI) y del cuerpo lúteo (CL), en los grupos clasificados como de bajo y alto nivel de AMH.

Fuente: Autoras

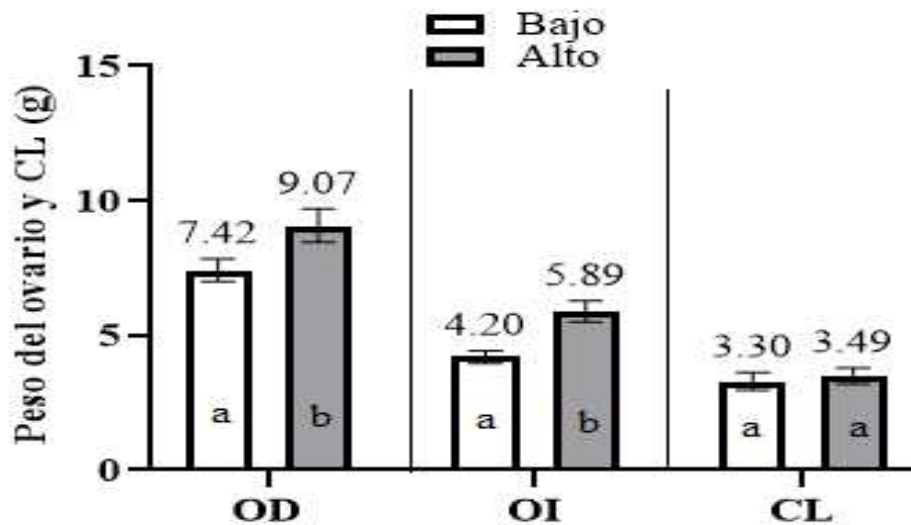


5.7.2 Peso promedio y error estándar de los ovarios (OD; OI) y del cuerpo lúteo (CL)

El peso promedio y error estándar del ovario derecho (OD), observado en el grupo de alto ($9,07 \pm 0,62g$) y bajo ($7,42 \pm 0,42g$) nivel de AMH presentaron diferencia estadísticamente ($P < 0,05$) entre grupos. En el caso del ovario izquierdo también se observó esta diferencia entre los grupos clasificados como de alto ($5,89 \pm 0,39g$) y bajo ($4,2 \pm 0,23g$) nivel de AMH. **Fig. 12.**

Sin embargo, el peso del cuerpo lúteo fue similar ($P > 0,05$), en los grupos de alto ($3,49 \pm 0,30g$) y bajo ($3,3 \pm 0,33g$) nivel de AMH. **Fig. 12.** Esta singularidad es similar a la presentada con la variable tamaño de CL (ítem anterior), lo cual nos permite pensar que la cantidad de hormona Antimulleriana no tiene influencia directa el peso y tamaño del cuerpo lúteo, no así sobre tamaño y peso del ovario, estructura en la cual se encuentran los folículos en mayor o menor número y esto mantiene relación directa con la cantidad de AMH, pudiendo influir sobre el peso y tamaño final del ovario Martínez *et al.* (87).

De la revisión realizada se ha podido comprobar que son pocos los trabajos que relacionan la morfología del ovario con el nivel de AMH, uno de ellos es el realizado por Ireland *et al.* (54), quienes clasifican en grupos de alto $7,11 \pm 0,41g$ y bajo $3,05 \pm 0,33g$, nivel de AMH y establecen que existe diferencia estadística entre grupos ($P < 0,05$). Los valores determinados por Ireland *et al.*, son menores a los observados en el presente estudio; sin embargo, es necesario recalcar que ellos dan un solo valor del peso de los ovarios para cada grupo (alto y bajo), diferente a lo que nosotros realizamos analizando por separado los dos ovarios (OD e OI), a pesar de la diferente metodología utilizada la tendencia de que el grupo clasificado como de alto nivel de AMH tenga pesos mayores en comparación con los de bajo nivel son similares en los dos trabajos.



Prueba de T de Student ab=diferencia estadística entre grupos en cada grupo.

Figura 12: Comparación del peso promedio de los ovarios derecho (OD) e izquierdo (OI) y del cuerpo lúteo (CL), en los grupos clasificados como de bajo y alto nivel de AMH.

Fuente: Autoras

5.8 Valores promedios de la Hormona Antimulleriana (AMH), el Recuento visual y ecográfico de los Folículos Antrales (RFA), mayores y menores a 4mm, en diferentes momentos del ciclo estral, así como del número de onda folicular y la fase de la misma

Debido a que se desconocía el momento del ciclo estral en el cual se encontraban las vaquillas al momento de su faenamiento, se infirió la misma conjugando, las características del cuerpo lúteo (presencia=87,25% u ausencia=12,75%), tamaño promedio del CL, tamaño del folículo más grande encontrado en uno de los dos ovarios de cada animal; así como, el número de folículos presentes en los dos ovarios.



El tamaño del CL observado en metaestro fue de $10,53 \pm 0,97$ mm; rango entre 5-19,5mm, diestro ($17,23 \pm 0,40$ mm; rango entre 12,5-27mm) y proestro ($12,4 \pm 0,64$ mm; rango entre 8-17mm), con diferencia estadística entre diestro vs metaestro y diestro vs proestro ($P < 0,05$); sin embargo, entre metaestro y proestro no hubo diferencia del tamaño del CL ($P > 0,05$).

Al respecto Ayala *et al.* (69), al valorar el tamaño del CL en los días 6 y 12 del ciclo estral (diestro) de vaquillas Holstein mestizas establecieron un tamaño promedio de $16,9 \pm 0,98$ mm día 6 y; $24,2 \pm 1,15$ mm día 12, valores que están dentro del rango descrito en la fase de diestro en el presente trabajo (de 12,5 a 27mm), pero, ellos en este trabajo no valoran el tamaño del CL en metaestro y proestro. Sin embargo, Ayala *et al.*, en el año 2019 publicaron tamaños del CL de vaquillas de raza criolla ecuatoriana y describieron valores promedios de $14,4 \pm 0,23$ mm en la fase de crecimiento (metaestro); $16,3-21,7$ mm fase de estática (diestro) y un tamaño $< 12,3$ mm en la fase de regresión (proestro), valores que son similares a los determinados en el presente estudio.

A nivel internacional hay trabajos como el realizado por Chasombat *et al.* (88), quienes valoraron la dinámica folicular en vaquillas nativas tailandesas, determinando que el tamaño promedio del CL hemorrágico (metaestro) fue de $8,5 \pm 0,20$ mm y en el diestro llegaban a su valor promedio máximo de $13,55 \pm 0,17$ mm, medidas que coinciden y fortalecen los resultados obtenidos en cada una de las fases del presente trabajo.

5.8.1 Promedio del Recuento visual y ecográfico de los Folículos Antrales (RFA) > 4 mm y < 4 mm en las fases del ciclo estral (metaestro, diestro y proestro), y niveles de AMH

Se determinó que el 25,49% (26/102), vaquillas se encontraban en metaestro al ser faenadas, el 48,03% (49/102) en diestro y en proestro el 26,47% (27/102).

El recuento de folículos antrales mayores y menores a 4mm, realizado mediante la técnica ecográfica y visual directa, estableció que en las tres etapas del ciclo estral (metaestro; diestro y proestro) no se presentó diferencia ($P > 0,05$) estadística, (**tabla 4**).



Una vez organizados los ovarios de las vaquillas en estudio de acuerdo al momento del ciclo estral en la cual fueron faenadas: metaestro (n=26), diestro (n=49) y proestro (n=27), se valoró el nivel de hormona antimulleriana en cada una de estas etapas, llegando a determinar que no existió diferencia estadística ($P>0,05$) entre el metaestro ($0,085\pm 0,02\text{ng/ml}$), diestro ($0,078\pm 0,01\text{ng/ml}$), y proestro ($0,075\pm 0,01\text{ng/ml}$), **tabla 4**. Datos que coinciden con lo descrito por Souza *et al.*, (2015), quienes establecen que el nivel de AMH es similar en las diferentes fases del ciclo estral: metaestro ($133,2 \pm 10,6 \text{ pg/ml}$), diestro ($150,9 \pm 10,6 \text{ pg/ml}$) y proestro ($132,7 \pm 9,7 \text{ pg/ml}$). Lamentablemente, ellos describieron los valores de la AMH en pg/ml; sin embargo, si transformamos estos valores a ng/ml, podemos decir que el nivel de AMH determinado por Souza *et al.*, se encuentra cercano a lo establecido en el presente trabajo, la diferencia podría explicarse debido a la categoría zootécnica de los animales utilizados en cada uno de los experimentos (múltiparas vs vaquillas respectivamente), además, el sistema de explotación (intensivo vs extensivo).

Tabla 4: Valores promedios de la Hormona Antimulleriana (AMH), recuento visual y ecográfico de los folículos antrales (RFA), mayores y menores a 4mm, en diferentes momentos del ciclo estral: metaestro (n=26), diestro (n=49) y proestro (n=27), del total de animales.

	Metaestro	Diestro	Proestro	P
AMH	0,085±0,02	0,078±0,01	0,075±0,01	Ns
RFA<4mm (visual)	27,9±3,35	27,5±2,39	25,0±3,81	Ns
RFA>4mm (visual)	6,0±0,63	6,6±0,52	6,0±0,72	Ns
RFA<4mm (US)	15,3±1,75	16,8±1,35	15,6±1,46	Ns
RFA>4mm (US)	6,8±0,69	6,6±0,44	6,4±0,53	Ns

RFA=Recuento de folículos antrales. US=ultrasonografía. Prueba de Tukey 5%. *=diferencia estadística entre columnas

Fuente: Autoras



5.8.2 Promedio del Recuento visual y ecográfico de los Folículos Antrales (RFA) > y <4mm encontrados en la primera, segunda o tercera onda folicular, así como los niveles de AMH

Al valorar el número de onda folicular (primera, segunda y tercera) en la cual se encontraban las vaquillas al momento de su faenamiento, se estableció que el 6,86% (7/102) estuvieron en la primera onda folicular, el 52,94% (54/102) segunda y el 40,19% (41/102) tercera onda folicular.

Además, el RFA mayores y menores a 4mm encontrado en la primera, segunda y tercera onda folicular no presentaron diferencia ($P>0,05$) estadística entre las mismas, (**tabla 5**).

La similitud del número de folículos antrales (RFA) en las diferentes ondas foliculares (1era, 2da y 3ra) en el presente estudio, podría ser explicado por los conceptos emitidos por Wiltbank *et al.* (89), quienes mencionaron que la dinámica folicular en el bovino está organizada por ondas foliculares y que a decir de varios autores existen animales de dos y tres ondas foliculares Bó *et al.*, (90); e incluso se describen animales con una y cuatro ondas foliculares Ginther *et al.*, (70), distribuidas a lo largo del ciclo estral del bovino.

Además, se determinó que los folículos que aparecen (pool) en la fase de reclutamiento (1ra fase de cada una de las ondas foliculares), crecen a un ritmo de 1,1-1,2mm diarios, llegando a la fase de selección (2da fase) entre 5-6mm y a la etapa de dominancia (3ra fase), cuando estos tienen un diámetro >10mm Tovío, (74), aproximadamente al día $6,4\pm 0,4$ d en la primera onda folicular Sirois & Fortune, (91). Si bien en la etapa de selección solo un folículo del grupo disponible es seleccionado para continuar con su desarrollo y los demás inician un proceso de atresia y luego de atresia al día $8,34\pm 0,17$ d Chasombat *et al.* (88), a un promedio de 0,8mm por día Ayala *et al.* (71), tardando entre 5-7 días para desaparecer. Por lo tanto, durante la onda folicular sea esta primera, segunda o tercera, el número de folículos antrales presentes es similar lo que cambia es el tamaño del dominante y los subordinados.



El enunciado anterior es fortalecido por los resultados descritos por Chasombat *et al.* (88), quienes establecen que el número de folículos reclutados en animales de dos ondas es estadísticamente similar; sin embargo, difieren con los animales que poseen tres ondas foliculares. Pero esto sucede únicamente al confrontar el número de folículos reclutados en la segunda y tercera onda folicular de los animales de tres ondas Ayala *et al.* (71).

Los valores de AMH determinados en la primera, segunda y tercera onda folicular fueron similares ($P>0,05$), **tabla 5**. Si bien no encontramos trabajos que analicen el nivel de hormona Antimulleriana en las diferentes ondas foliculares del bovino, para poder confrontarlos con nuestros resultados, inferimos que los valores similares de AMH encontrado en el presente trabajo en las diferentes ondas foliculares, se encuentra ligado a la cantidad de folículos antrales <4mm presentes en cada una de estas ondas foliculares (1era, 2da y 3ra onda), que como ya se indicó anteriormente presentaron valores similares ($P>0,05$), **tabla 5**. A esta conjetura se llegó basado en el concepto emitido por La Marca & Volpe (92), quienes describen que la AMH es secretada por las células de la granulosa de los folículos antrales primarios a tempranos (<4mm), de allí que es lógico que los valores de AMH fuesen similares en la primera, segunda y tercera onda folicular de los animales en estudio.



Tabla 5: Valores promedios de la Hormona Antimulleriana (AMH), el Recuento Visual y ecográfico de los Folículos Antrales (RFA), mayores y menores a 4mm, en la primera (n=7), segunda (n=54) y tercera (n=41) onda folicular del total de animales en estudio (n=102).

	1era onda	2da onda	3ra onda	P
AMH	0,051±0,01	0,088±0,01	0,072±0,01	ns
RFA<4mm (visual)	19,3±4,49	29,5±2,54	24,9±2,57	ns
RFA>4mm (visual)	5,1±1,55	6,1±0,47	6,7±0,56	ns
RFA<4mm (US)	12,3±3,28	18,5±1,25	13,7±1,17	*
RFA>4mm (US)	6,0±1,48	6,8±0,45	6,3±0,40	ns

RFA=Recuento de folículos antrales. US=ultrasonografía. Prueba de Tukey 5%. *=diferencia estadística entre columnas.

Fuente: Autoras

5.8.3 Promedio del Recuento visual y ecográfico de los Folículos Antrales (RFA) >4mm y <4mm encontrados en la fase de reclutamiento, selección y dominancia de las diferentes ondas foliculares de las 102 vaquillas en estudio, así como los valores de la AMH

Finalmente, se estableció que el 54,90% (56/102) de los animales se encontraban en fase de reclutamiento, el 26,47% (27/102) en selección y un 18,62% (19/102) en fase de dominancia.

Se determinó por conteo visual que el número de folículos <4mm presentes en la fase de reclutamiento (33,4±2,51folículos) y selección (24,2±2,22folículos), fueron estadísticamente similares ($P>0,05$), sin embargo, estas dos fases (reclutamiento y selección) poseían mayor RFA en comparación con la fase de dominancia (11,8±1,96folículos).



En contraposición, el número de folículos antrales >4mm determinados en forma visual fue similar ($P>0,05$) en las tres fases de la onda folicular, (**tabla 6**).

La presencia de un mayor número de folículos antrales <4mm en las fases de reclutamiento y selección en comparación con la fase de dominancia, podría ser explicada por el ritmo de crecimiento de los folículos de 1,1-1,2mm diarios Tovió, (74) y que la fase de dominancia inicia aproximadamente en el día $6,4\pm 0,4$ d en la primera onda folicular Sirois & Fortune, (91).

Esta teoría es fortalecida por el trabajo realizado por Gimenes *et al.*, (93), quienes determinaron que el número de folículos antrales presentes en el día 1, 3 y 5 del ciclo estral (primera onda folicular) fueron similares ($P>0,05$) estadísticamente ($23,1 \pm 2,6$ mm (día 1); $21,7\pm 2,3$ (día 3); $21,5\pm 2,2$ (día 5), lo cual serían considerados las fases de reclutamiento (1d) y selección (día 3-5).

El RFA <4mm está íntimamente relacionado con la cantidad de AMH presente en las fases de reclutamiento, selección y dominancia en las diferentes ondas foliculares de las vaquillas en estudio. Se estableció que los valores promedios de AMH en la fase de reclutamiento ($0,096\pm 0,01$ ng/ml) fue mayor ($P<0,05$) a la expresada en la fase de dominancia ($0,050\pm 0,01$ ng/ml); sin embargo, la cantidad de AMH en la fase de selección fue similares a los de la fase de reclutamiento y selección ($0,064\pm 0,01$ ng/ml), **tabla 6**.

La explicación fisiológica a la cantidad de AMH encontradas en las diferentes fases de la onda folicular, podrían ser explicadas por lo descrito por Monniaux *et al.* (94), quienes determinaron que en el ganado bovino, la concentración de AMH en el líquido folicular de los folículos antrales (3 mm de diámetro) disminuyó durante el crecimiento de estos. Además, se ha establecido que conforme crecen los folículos sobre los 5mm la cantidad de AMH va disminuyendo paulatinamente Rico *et al.* (12).

Por lo tanto, y considerando que los folículos <4mm estuvieron en mayor cantidad en la fase de reclutamiento, es lógico que posean valores más altos de AMH, en comparación con la fase de dominancia. Sin embargo, es similar al de la fase de selección por el mismo principio (igual RFA).



Tabla 6: Valores promedios de la Hormona Antimulleriana (AMH), el Recuento Visual y ecográfico de los Folículos Antrales (RFA), mayores y menores a 4mm, observados en la fase de reclutamiento (n=56), selección (n=27) y dominancia (n=56) de las diferentes ondas.

	Reclutamiento	Selección	Dominancia	P
<i>AMH</i>	0,096±0,01 ^b	0,064±0,01 ^{ab}	0,050±0,01 ^a	*
<i>RFA<4mm (visual)</i>	33,4±2,51 ^b	24,2±2,22 ^b	11,8±1,96 ^a	*
<i>RFA>4mm (visual)</i>	6,4±0,52	6,6±0,64	5,4±0,65	Ns
<i>RFA<4mm (US)</i>	18,8±1,13 ^b	15,4±1,49 ^b	9,3±1,77 ^a	*
<i>RFA>4mm (US)</i>	6,9±0,64	5,6±0,57	6,6±0,30	Ns

RFA=Recuento de folículos antrales. US=ultrasonografía. Prueba de Tukey 5%. *=diferencia estadística entre columnas.

Fuente: Autoras



6. CONCLUSIONES

- Las vaquillas Holstein mestizas con valores $>0,08\text{ng/ml}$ son consideradas como animales con alto nivel de AMH.
- El recuento de folículos antrales $<4\text{mm}$ es más efectivo por la técnica visual directa en comparación con la ultrasonografía; sin embargo, la valoración de folículos $>4\text{mm}$ puede realizarse con la misma efectividad por las dos técnicas (ecográfica y visual).
- Los animales con niveles altos de hormona Antimulleriana, poseen ovarios más pesados y con mayor tamaño en comparación con los animales con bajos niveles de AMH. Sin embargo, el tamaño del CL es similar en los dos grupos en estudio.
- Las vaquillas de raza Holstein mestizas criadas sobre los 2500msnm mantienen una correlación positiva y significativa entre los niveles de AMH evaluada (pre-mortem) y el RFA valorados directamente en los ovarios recuperados de estos animales.



7. RECOMENDACIONES

Los métodos avanzados, que han sido implementados satisfactoriamente y han dado resultados eficientes para el desarrollo de las biotecnologías, deben ser considerados como una herramienta principal para el mejoramiento genético de las ganaderías tanto en nuestro país como a nivel mundial; no obstante, se debería tomar en cuenta esta información para la selección de donadoras y de ahí partir con el objetivo de perfeccionar la reproducción animal.

Con un fin investigativo se puede realizar otros proyectos que impliquen la comparación de recuento folicular antral (RFA) pos-mortem con relación a los niveles de la hormona Antimulleriana, que implique la utilización de vacas multíparas y considerando otras razas para los estudios comparativos.

Los médicos veterinarios deben tener constante disciplina que conlleve a una planificación, monitorización y evaluación para la aplicación de las biotecnologías, integrando otras fuentes de conocimiento, permitiéndose llevar con éxito en cada uno de los procedimientos realizados para la obtención de resultados eficientes.



8. BIBLIOGRAFÍA

1. Mapletoft RJ, Bó GA, Baruselli PS, Menchaca A, Sartori R. Evolution of knowledge on ovarian physiology and its contribution to the widespread application of reproductive biotechnologies in South American cattle. *Anim Reprod.* 2018;15(Irrs):1003–14.
2. Martínez D. Situación actual de la transferencia embrionaria. revisión y actualización. *Frisona Española.* 2008;164:74–80.
3. Jiménez C. Superovulación: Estrategias, factores asociados y predicción de respuesta superovulatoria en bovinos. *Rev la Fac Med Vet y Zootec.* 2009;56(III):195–214.
4. Kadokawa H, Tameoka N, Uchiza M, Kimura Y, Yonai M. Short communication: A field study on the relationship between body condition and embryo production in superovulated holstein yearling heifers. *J Dairy Sci* [Internet]. 2008;91(3):1087–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0642>
5. Jarvis LS, Jarvis LS. Multiple Ovulation and Embryo Transfer (MOET). *Potential Eff Two New Biotechnol World Dairy Ind.* 2019;2:41–77.
6. Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P, et al. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod.* 2007;22(6):1687–95.
7. Singh J, Domínguez M, Jaiswal R, Adams GP. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology.* 2004;62(1–2):227–43.
8. Perry GA, Cushman RA. Invited Review: Use of ultrasonography to make reproductive management decisions. *Prof Anim Sci.* 2016;32(2):154–61.
9. Durocher J, Morin N, Blondin P. Effect of hormonal stimulation on bovine



- follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. *Theriogenology*. 2006;65(1):102–15.
10. Abdel Aziz RL, Khalil AAY, Abdel-Wahab A, Hassan NY, Abdel-Hamied E, Kasimanickam RK. Relationship among circulating anti-Müllerian hormone, insulin like growth factor 1, cadmium and superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology*. 2017;100:72–9.
 11. Ireland JJA, Smith GWB, Scheetz DA, Folger JKA. Ireland, 2011 Does size matter in females An overview of the impact of. 2011;(2):1–14.
 12. Charlene Rico, Stephane Fabre, Claire Me´digue,5 Nathalie di Clemente,6 Fre´de´rique Cle´ment,5 Martine Bontoux,3 Jean-Luc Touze´,3 Mickae¨l Dupont,4 Eric Briant,4 BenoîtRe´my,7 Jean-Franc¸ois Beckers 7 and Danielle Monniaux2. Anti-Mullerian Hormone Is an Endocrine Marker of Ovarian Gonadotropin-Responsive Follicles and Can Help to Predict Superovulatory Responses in the Cow. *Biol Reprod*. 2009;80(1):50–9.
 13. Baldrighi J, Sá Filho MF, Batista EOS, Lopes RNVR, Visintin JA, Baruselli PS, et al. Anti-Mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. *Reprod Domest Anim*. 2014;49(6):1015–20.
 14. Batista EOS, Macedo GG, Sala R V., Ortolan MDDV, Sá Filho MF, Del Valle TA, et al. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in bos indicus (nelore) and bos taurus (holstein) heifers. *Reprod Domest Anim*. 2014;49(3):448–52.
 15. Monniaux D, Drouilhet L, Rico C, Estienne A, Jarrier P, Touzé JL, et al. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. *Reprod Fertil Dev*. 2013;25(1):1–16.
 16. Martins G, Silva-santos KC, Ricardo T, Barreiros R, Morotti F, Valente B, et al. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. *Anim Reprod Sci*. 2016;165:17–21.



17. Durlinger ALL, Visser JA, Themmen APN. Regulation of ovarian function: The role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction*. 2002;124(5):601–9.
18. Poole DH, Ocón-Grove OM, Johnson AL. Anti-Müllerian hormone (AMH) receptor type II expression and AMH activity in bovine granulosa cells. *Theriogenology* [Internet]. 2016;86(5):1353–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.078>
19. Dejarnette M, Nebel R. Anatomía y Fisiología de la Reproducción Bovina. *Selección Soluciones Reprod*. 2010;02,03.
20. Filipiak Y, Viqueira M, Bielli A. Development and follicular dynamics from fetal life until puberty in cattle Filipiak. 2016;14–22.
21. Shrestha K, Rodler D, Sinowatz F, Meidan R. Corpus Luteum Formation. 2019.
22. Olivera A M, Tarazona M A, Ruíz C T, Giraldo E C. Vías implicadas en la luteólisis bovina. *Rev colomb cienc pecu*. 2007;20(3):387–93.
23. Uribe-Velásquez LF, Osorio JH, Correa-Orozco A. Corpus Luteum: an Immunological View. *Biosalud*. 2011;10(2):87–100.
24. Carlos A, Gilberto F, Pedro H, Eduardo R. Función y regresión del cuerpo lúteo durante el ciclo estral de la vaca. *Abanico Vet*. 2019;9(1):1–21.
25. Hampel R, Šnajderová M, Mardešić T. Antimüllerian hormone (amh) not only a marker for prediction of ovarian reserve. *Physiol Res*. 2011;60(2):217–23.
26. Henao RG. Algunos factores relacionados con la dinámica folicular en *Bos indicus*. *Rev Fac Nac Agron*. 2010;63(2):5577–86.
27. Motta Delgado PA, Ramos Cuéllar N, González Sánchez CM, Rojas Castro EC. Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *Vet y Zootec*. 2011;5(2):88–99.
28. Palma G. *Biología de la reproducción*. 2nd ed. Mar del Plata: INTA; 2008.



29. Palma G. *Biología de la Reproducción Ciencia, Tecnología y Sociedad*. 2011;48.
30. Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*. 2008;69(1):72–80.
31. Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid1. *Biol Reprod*. 2010;82(6):1021–9.
32. Vásquez - Cano J, Olivera - A M. *Señalización Celular en el Folículo Antral Bovino*. Orinoquia. 2010;
33. S.A SU. *Compendium de reproducción animal de Intervet (9o. Edición)*. Intervet [Internet]. 2007;439. Available from: http://www.sinervia.com/pdf/resources/32/651_compendio_reproduccion_animal_intervet.pdf
34. Webb R, Armstrong DG. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: A review. *Livest Prod Sci*. 1998;53(2):95–112.
35. Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*. 1994;101(3):547–55.
36. Bavera G. *Fisiología reproductiva del bovino*. *Prod Anim*. 2005;4–7.
37. Velázquez C. *Fisiología de la reproducción bovina*. NewMedigraphicCom. 2012;1–30.
38. Hernández Cerón J. *Fisiología Clínica de la Reproducción de Bovinos Lecheros*. *Fisiol Clínica la Reprod Bov Leche*. 2016;(978-607-00-5524–9):17–28.
39. Guaqueta H. Ciclo estral: fisiología básica y estrategias para mejorar la detección de celos. *Rev med vet zoot*. 2009;56(3):163–83.
40. Leroy J, Soom A Van, Opsomer G, Goovaerts IGF, Bols PEJ. Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in



- Danger. Part II Mechanisms Linking Nutrition and Reduced Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows * Starch-rich Diets to Augment Dietary Energy. 2008;632:623–32.
41. Rippe CA. EL CICLO ESTRAL. 2016;(March 2015):7.
 42. Rangel L. Ciclo estral en bovinos. Mec Prod y Reprod Adapt Cienc Anim. 2003;3,4.
 43. Saumande J, Humblot P. The variability in the interval between estrus and ovulation in cattle and its determinants. 2005;85:171–82.
 44. J. Hernández; El ciclo estral de la vaca. Zaragoza, España; 2008. p. 284.
 45. Miguel L, Tintín N. Universidad de cuenca facultad de ciencias agropecuarias carrera de medicina veterinaria y zootecnia. 2019.
 46. Josso N, Rey RA, Picard JY. Anti-Müllerian hormone: A valuable addition to the toolbox of the pediatric endocrinologist. Int J Endocrinol. 2013;2013.
 47. Carranza-Lira S, Bustamante-Mendoza JA, Leños-Miranda A, Campos-Galicia I, Estrada-Moscoso I, Chan-Verdugo R, et al. Concentraciones en suero de hormona antimülleriana en mujeres con y sin miomatosis uterina. Ginecol Obstet Mex. 2013;81(12):700–5.
 48. Karkanaki A, Vosnakis C, Panidis D. The clinical significance of anti-müllerian hormone evaluation in gynecological endocrinology. Hormones. 2011;10(2):95–103.
 49. Mossa F, Jimenez-Krassel F, Scheetz D, Weber-Nielsen M, Evans ACO, Ireland JJ. Anti-Müllerian Hormone (AMH) and fertility management in agricultural species. Reproduction. 2017;154(1):R1–11.
 50. Monniaux D, Rico C, Larroque H, Dalbiès-Tran R, Médigue C, Clément F, et al. Anti-Müllerian hormone, an endocrine predictor of the response to ovarian stimulation in the bovine species. Gynecol Obstet Fertil. 2010;38(7–8):465–70.
 51. La Marca A, Nelson SM, Sighinolfi G, Manno M, Baraldi E, Roli L, et al.



- Anti-Müllerian hormone-based prediction model for a live birth in assisted reproduction. *Reprod Biomed* [Internet]. 2011;22(4):341–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.11.005>
52. Almog B, Shehata F, Suissa S, Holzer H, Shalom-Paz E, La Marca A, et al. Age-related normograms of serum antimüllerian hormone levels in a population of infertile women: A multicenter study. *Fertil Steril*. 2011;95(7):2359–64.
 53. Seifer DB, Golub ET, Lambert-Messerlian G, Benning L, Anastos K, Watts DH, et al. Variations in serum müllerian inhibiting substance between white, black, and Hispanic women. *Fertil Steril* [Internet]. 2009;92(5):1674–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.110>
 54. Ireland JLH, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen APN, Ward F, Lonergan P, et al. Antral Follicle Count Reliably Predicts Number of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle¹. *Biol Reprod*. 2008;79(6):1219–25.
 55. Jimenez-Krassel F, Scheetz DM, Neuder LM, Ireland JLH, Pursley JR, Smith GW, et al. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. *J Dairy Sci*. 2015;98(5):3036–45.
 56. Pfeiffer KE, Jury LJ, Larson JE. Determination of anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. *Domest Anim Endocrinol* [Internet]. 2014;46(1):58–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2013.05.004>
 57. Souza AH, Carvalho PD, Rozner AE, Vieira LM, Hackbart KS, Bender RW, et al. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *J Dairy Sci* [Internet]. 2015;98(1):169–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8182>
 58. Rajpert-De Meyts E, Jørgensen N, Græm N, Müller J, Cate RL, Skakkebaek



- NE. Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: Association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(10):3836–44.
59. Weenen C, Laven JSE, von Bergh ARM, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: Potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod.* 2004;10(2):77–83.
60. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. 2006;12(6):685–718.
61. Broekmans FJM, Dorland M, Habbema JDF, Looman CWN. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in. 1999;72(5):845–51.
62. Nelson SM, Ph D. Biomarkers of ovarian response : current and future applications. *Fertil Steril [Internet].* 2013;99(4):963–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.051>
63. Gomez RL. Universidad de cuenca facultad de ciencias agropecuarias escuela de medicina veterinaria y zootecnia. Tesis De Grado. 2011;1–91.
64. Bo GA. Ultrasonografía reproductiva en ganado bovino. *Sitio Argentino Prod Anim.* 2000;1(2):23–39.
65. Quintela LA, Becerra J, García P. Atlas de ecografía en la vaca. 2009;(January).
66. Giraldo E, E CG. PRINCIPIOS BÁSICOS DE ULTRASONOGRAFÍA VETERINARIA. 2003;
67. Sofía E, Camargo C, Manuel E, Barón P. Aplicaciones de la ultrasonografía en la reproducción bovina revisión. *Cienc y Agric.* 2012;9(2):29–37.
68. Bellenda OG, Medical P. La ecografía aplicada a la reproducción en especies de interés productivo. 2003;1–7.



69. Ayala L, Pesántez J, Rodas E, Méndez S, Soria M, Torres S, et al. Tamaño del folículo ovulatorio, cuerpo lúteo y progesterona sanguínea en vaquillas receptoras de embriones de tres razas en pastoreo en Ecuador. *Rev Prod Anim.* 2017;29(2):65–72.
70. Ginther OJ. The theory of follicle selection in cattle. *Domest Anim Endocrinol* [Internet]. 2016;57:85–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.06.002>
71. Ayala LE, Pesantez JL, Rodas ER, Dután JB, Calle JR, Murillo YA, et al. Dinámica folicular de vaquillas Criollas al pastoreo en el altiplano ecuatoriano. *Arch Zootec.* 2019;68(262):184–90.
72. Guerreiro BM, Batista EOS, Vieira LM, Sá Filho MF, Rodrigues CA, Castro Netto A, et al. Plasma anti-mullerian hormone: An endocrine marker for invitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domest Anim Endocrinol* [Internet]. 2014;49(1):96–104. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2014.07.002>
73. Gobikrushanth M, Dutra PA, Bruinjé TC, Colazo MG, Butler ST, Ambrose DJ. 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.* 2017;92:90–4.
74. Tovío N. Factores relacionados con la dinámica folicular en la hembra bovina. *Univ Nac Colomb.* 2012;8(17):38–47.
75. Sartori R, Gimenes LU, Monteiro PLJ, Melo LF, Baruselli PS, Bastos MR. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. *Theriogenology* [Internet]. 2016;86(1):32–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.016>
76. Díez Bru N. Principios básicos de la ecografía. *Clínica Vet pequeños Anim.* 1992;12(3):0138–47.



77. Alonso-Alanusa L, Galina-Hidalgo C, Romero-Zúñiga JJ, Estrada-König S, Galindo-Badilla J. Utilidad de la palpación rectal y la ecografía transrectal en el diagnóstico de gestación del ganado cebú en el trópico húmedo de Costa Rica. *Rev Cient la Fac Ciencias Vet la Univ del Zulia*. 2012;22(1):9–16.
78. Souza AH, Carvalho PD, Rozner AE, Vieira LM, Hackbart KS, Bender RW, et al. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *J Dairy Sci*. 2015;1–10.
79. Xu J, Bishop C V., Lawson MS, Park BS, Xu F. Anti-Müllerian hormone promotes pre-antral follicle growth, but inhibits antral follicle maturation and dominant follicle selection in primates. *Hum Reprod*. 2016;31(7):1522–30.
80. Silva-Santos KC, Santos GMG dos, Siloto LS, Santos JT dos, Oliveira ER de, Machado FZ, et al. The correlation between the number of antral follicles and ovarian reserves (preantral follicles) in purebred *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *Anim Reprod Sci [Internet]*. 2014;151(3–4):119–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.10.016>
81. Astudillo K, Ayala L, Astudillo F, Samaniego J, Hernández J, Jaramillo M. Estado sanitario del aparato reproductor de vacas faenadas en el camal municipal de Cuenca, Ecuador. *Maskana*. 2017;8(22):73–6.
82. González T M, De La Rosa T E, Mendoza M C. Morfometría macroscópica del cuerpo lúteo de vacas cebú gestantes y no gestantes en el trópico colombiano. *Rev Colomb Cienc Anim - RECIA*. 2017;9(2):190.
83. Erales-villamil JA, Rodríguez-buenfil JC, Segura-correa JC. Estado y alteraciones del aparato reproductor de vacas sacrificadas en el rastro de Umán, Yucatán. *Univ y Cienc*. 2008;24(2):111–6.
84. De Souza JS, Alexandre EC, Quíntela LA, Becerra JJ, Cainzos J, Rivas F, et al. Incidencia de alteraciones en el aparato reproductor de vacas sacrificadas en un matadero comercial de la Provincia de Lugo (Noroeste



- de España). ITEA Inf Tec Econ Agrar. 2010;106(2):100–14.
85. Soto HC, González B, Rossi M, Godoy S, Bello A. Evaluación De La Actividad Ovárica De Bovinos Explotados En Condiciones Tropicales. *Zootenia Trop*. 1999;17 (1)(January 1999):13–7.
 86. Morotti F, Moretti R, dos Santos GMG, Silva-Santos KC, Ramos Cerqueira PH, Seneda MM. Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos indicus* cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination. *Anim Reprod Sci [Internet]*. 2018;188(June 2017):170–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.001>
 87. MARTÍNEZ RM. Efectos de la hormona antimulleriana (AMH) en bovinos. *Univ autónoma Agrar Antonio Narro*. 2015;76.
 88. Chasombat J, Nagai T, Parnpai R, Vongpralub T. Ovarian follicular dynamics and hormones throughout the estrous cycle in Thai native (*Bos indicus*) heifers. *Anim Sci J*. 2013;85(1):15–24.
 89. Wiltbank M, Madison, Pursley J, Prairie S. PROCESS FOR THE SYNCHRONIZATION OF OVULATION. *Prog Med*. 1996;28(12):3077–80.
 90. Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*. 1995;43(1):31–40.
 91. Sirois J, Fortune JE. Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in Heifers Monitored by Real-Time Ultrasonograph1. *Biol Reprod*. 1988;39(2):308–17.
 92. La Marca A, Stabile G, Carducci Artensio A, Volpe A. Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod*. 2006;21(12):3103–7.
 93. Gimenes LU, Ferraz ML, Fantinato-Neto P, Chiaratti MR, Mesquita LG, Sá Filho MF, et al. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect invitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. *Theriogenology*. 2015;83(3):385–93.

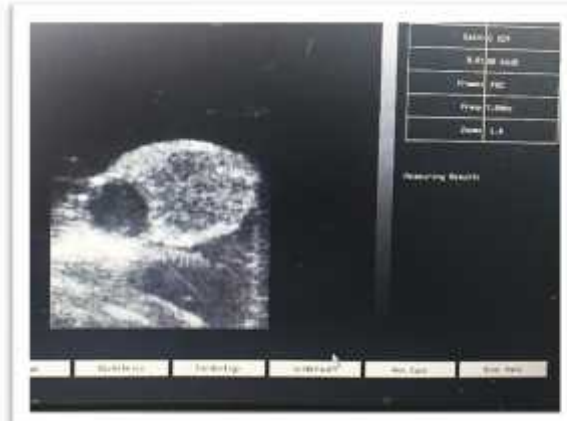


94. Monniaux D, Clemente N di, Touzé J-L, Belville C, Rico C, Bontoux M, et al. Intrafollicular Steroids and Anti-Müllerian Hormone During Normal and Cystic Ovarian Follicular Development in the Cow¹. *Biol Reprod.* 2008;79(2):387–96.

9. ANEXOS

9.1 Fotografías de la Investigación.

Anexo 1: Ecografías tomadas del ovario.



Presencia de cuerpo lúteo



Folículos >4mm



Cuerpo cavitario



Medidas del cuerpo lúteo



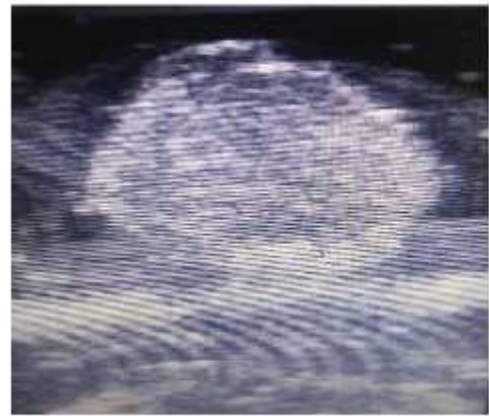
Medición de un Folículo grande



Ovario completo, folículos grandes



Medidas de un folículo > 4mm

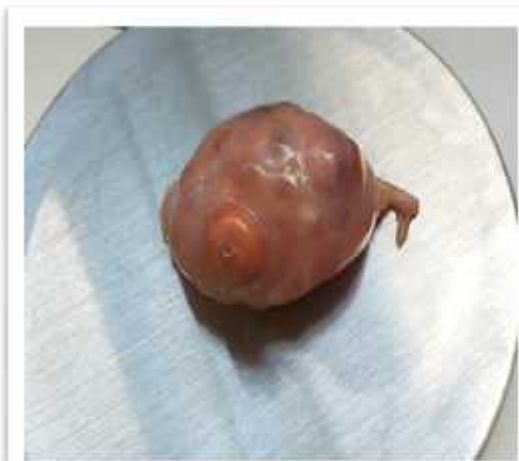


Folículos < 4mm



Ovarios con Folículos grandes y pequeños

Anexo 2: Ovarios y sus estructuras (valoración en forma directa-visual).



Ovario completo: CL, folículos



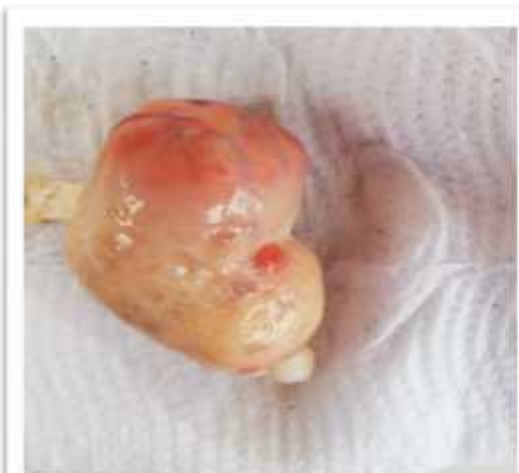
Cuerpo Lúteo



Cuerpo lúteo y folículos pequeños



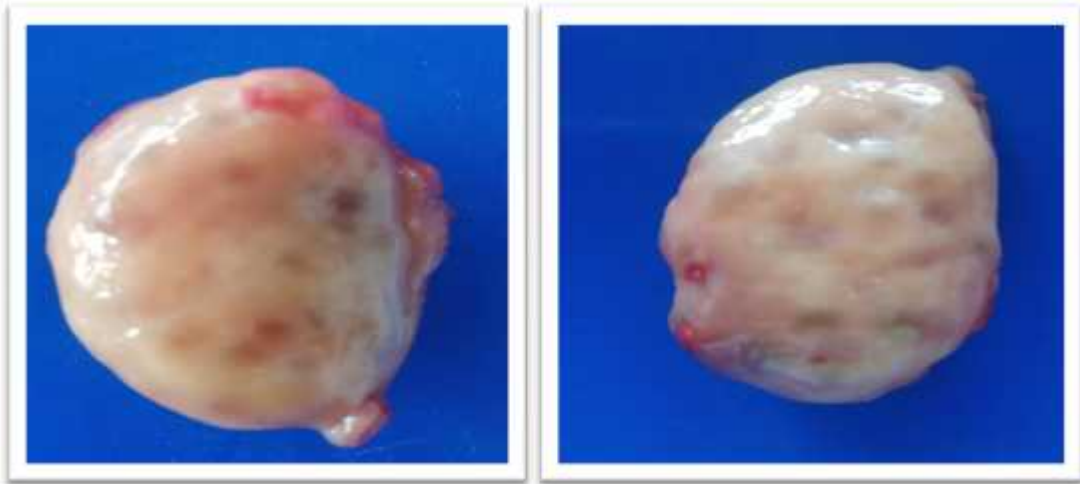
Ovarios derecho e izquierdo: Fase de Reclutamiento



OD: cuerpo lúteo hemorrágico



OI: CL en desarrollo: Metaestro



OD - OI: Cuerpo Lúteo hemorrágico, primera onda, fase de reclutamiento



Anexo 3: Obtención y procesamiento de las muestras de sangre.



Camal Municipal de Cuenca: corrales



Selección de vaquillas



Toma de muestras sanguíneas:
venopunción coccígea



Identificación y conservación de
muestras



Muestras listas. Lugar: Laboratorio
de la Universidad de Cuenca



Centrifugación de muestras
sanguíneas



Obtención de plasma Sanguíneo



Separación del plasma sanguíneo



Muestras de plasma sanguíneo en tubos eppendorf rotulados



Muestras listas para conservación



Anexo 4: Procedimiento para medición cuantitativa *in vitro* de AMH.



Laboratorio de Biología Molecular.
Facultad de CCAA. Universidad de
Cuenca



Placa para diluyente estándar.
preparación de muestras y
soluciones



Preparación de diluyente estándar



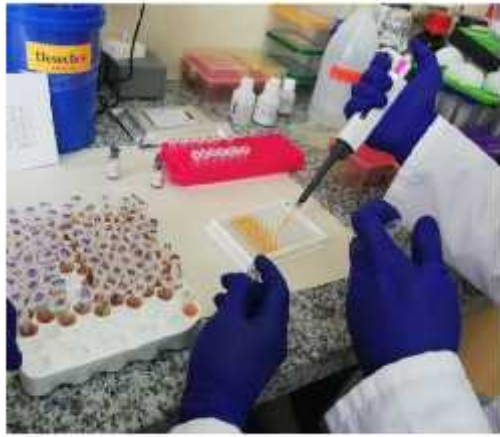
Placa y pocillos para AMH



Solución de detección A



Solución de detección B



Colocación de plasma y soluciones en pocillos



Incubación



Lavado de reactivos



Reacción: cambio de color de la placa



Lector de placas



Lectura de resultados

Anexo 5: Recuperación de ovarios en el Camal.



Vaquillas Marcadas



Seguimiento hasta el eviscerado



Recolección de ovarios



Ovario colectado



Ovarios en recipientes estériles con su respectiva etiqueta



Cooler para el transporte de ovarios

Anexo 6: Procesamiento de ovarios en el Laboratorio.



Ovario con tejidos adyacentes



Eliminación de tejidos adyacentes al ovario



Lavado de ovarios en solución salina



Valoración directa (visual) del ovario, un solo técnico



Valoración ecográfica por un solo técnico



Pesaje del Ovario



Enucleación del cuerpo lúteo



Anexo 7: Plantilla para registro de datos: medida y peso del ovario y CL; Recuento de folículos.

PLANTILLA PARA REGISTRO DE DATOS DE OVARIOS

FECHA: _____



UNIVERSIDAD DE CUENCA
Facultad de Ciencias
Agropecuarias

OVARIO DERECHO

	OBSERVACION			ULTRA SONOGRAFIA			
	Peso	M1	M2	PMD	M1	M2	PMD
OVARIO							
CUERPO LÚTEO							
Ovario SCL							

CONTEO FOLICULAR

	CANTIDAD					
	Foliculos <4			Foliculos ≥4		
FOLÍCULOS ≥4	M1	M2	PMD	M1	M2	PMD
Folículo 1						
Folículo 2						
Folículo 3						
Folículo 4						
Folículo 5						
Folículo 6						
Folículo 7						
Folículo 8						
Folículo 9						
Folículo 10						
Folículo 11						

OVARIO IZQUIERDO

	OBSERVACION			ULTRA SONOGRAFIA			
	Peso	M1	M2	PMD	M1	M2	PMD
OVARIO							
CUERPO LÚTEO							
Ovario SCL							

CONTEO FOLICULAR

	CANTIDAD					
	Foliculos <4			Foliculos ≥4		
FOLÍCULOS ≥4	M1	M2	PMD	M1	M2	PMD
Folículo 1						
Folículo 2						
Folículo 3						
Folículo 4						
Folículo 5						
Folículo 6						
Folículo 7						
Folículo 8						
Folículo 9						
Folículo 10						
Folículo 11						



Anexo 9: Modelo de registro para la recolección de datos para medición cuantitativa *in vitro* de AMH.

Plantilla: ANÁLISIS DE AMH												
Título: "Relación entre Niveles de Hormona Antimulleriana y recuento de folículos antrales en vaquillas Holstein mestizas pre y pos faenamiento"												
No de Examen	1		Fecha									
Responsable	Karina Londa & Sonia Gañan											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Estándar 1 (20 ng/ml)	Estándar 5 (1,25 ng/ml)	Control 1									
B	Estándar 1 (20 ng/ml)	Estándar 5 (1,25 ng/ml)										
C	Estándar 2 (10 ng/ml)	Estándar 6 (0,625 ng/ml)										
D	Estándar 2 (10 ng/ml)	Estándar 6 (0,625 ng/ml)										
E	Estándar 3 (5 ng/ml)	Estándar 7 (0,312 ng/ml)										
F	Estándar 3 (5 ng/ml)	Estándar 7 (0,312 ng/ml)										
G	Estándar 4 (2,5 ng/ml)	Estándar 8 (0 ng/ml)										
H	Estándar 4 (2,5 ng/ml)	Estándar 8 (0 ng/ml)										Control 2