



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

DIRECCIÓN DE CARRERA: PECUARIA

**INFORME DE TRABAJO DE TITULACIÓN
PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO**

MODALIDAD: TRABAJO DE TITULACIÓN

**TEMA:
EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE HORMONA
ANTIMÜLLERIANA SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR EN
VAQUILLAS BRAHMAN**

**AUTORES:
EFRÉN NARCILO ALCÍVAR ARTEAGA
MARCO VINICIO ARTEAGA VERA**

**TUTOR:
DR. JORGE IGNACIO MACÍAS ANDRADE, Mg.**

CALCETA, ABRIL 2019

DERECHOS DE AUTORÍA

Efrén Narcilo Alcívar Arteaga y Marcos Vinicio Arteaga Vera, declaran bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedemos los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su reglamento.

.....
EFRÉN N. ALCÍVAR ARTEAGA
C.I. 131335872-1

.....
MARCO V. ARTEAGA VERA
C.I. 131370190-4

CERTIFICACIÓN DE TUTOR

Jorge Ignacio Macías Andrade, certifica haber tutelado el trabajo de titulación **EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE HORMONA ANTIMÜLLERIANA SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR EN VAQUILLAS BRAHMAN**, que ha sido desarrollada por Efrén Narcilo Alcívar Arteaga y Marcos Vinicio Arteaga Vera, previa a la obtención del título de Médico Veterinario, de acuerdo con el **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria De Manabí Manuel Félix López.

.....
DR. JORGE I. MACÍAS ANDRADE, Mg.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaran que han **APROBADO** el trabajo de titulación **EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE HORMONA ANTIMÜLLERIANA SOBRE LA DINÁMICA FOLICULAR EN VAQUILLAS BRAHMAN**, que ha sido propuesta, desarrollada y sustentada por Efrén Narcilo Alcívar Arteaga y Marcos Vinicio Arteaga Vera, previa la obtención del título de Médico Veterinario, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria De Manabí Manuel Félix López.

.....
M.V.Z KAROLINA LÓPEZ
RAUSCHEMBERG, Mg.Sc.

MIEMBRO

.....
M.V. JOFRE A. VERA CEDEÑO, Mg.Sc.

MIEMBRO

.....
DR. DERLYS H. MENDIETA CHICA, Mg.Sc.

PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de adquirir una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día.

A Dios por darme la vida y por otorgarme la sabiduría y la fortaleza para seguir adelante, sin desfallecer a pesar de las dificultades que se me han presentado.

A mis padres por ser los pilares fundamentales de mi vida. Gracias por su amor, cariño y apoyo incondicional y por enseñarme que el esfuerzo permite cumplir objetivos y llegar a la meta.

A mis hermanas, por brindarme siempre su apoyo y cariño incondicional, les quiero y estimo mucho.

A mis docentes que se convirtieron en mis guías, y me brindaron su sabiduría para contribuir y mejorar a mi crecimiento como persona y como profesional.

Al Dr. Ignacio Macías Andrade, tutor del trabajo de titulación, por su gran colaboración y constante apoyo tanto en la realización de este trabajo como en mi formación profesional.

Al Dr. Ernesto Antonio Hurtado, por su gran aporte y contribución en el desarrollo del trabajo de titulación y en mi formación personal y profesional.

A mis amigos y compañeros, que en este camino se convirtieron en parte de mi familia, gracias por su amistad verdadera y su apoyo.

A todos mis futuros colegas que me ayudaron de manera desinteresada, gracias infinitas por toda su ayuda y buena voluntad.

Y a todos aquellos seres queridos que de una u otra forma contribuyeron positivamente en este largo camino.

.....
EFRÉN N. ALCÍVAR ARTEAGA

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a Dios por el amor, misericordia y bondad con los que conduce mi camino.

A mis padres, Remberto Alcívar y Flor Arteaga, por brindarme la posibilidad de estudiar mi carrera universitaria y, además, guiarme en mi formación personal y profesional. Con todo el cariño y la admiración del mundo, gracias por haberme inculcado los valores necesarios para llegar a esta etapa en mi vida.

A mis hermanas, Josselyn y Cinthya. Por todo el cariño, amor y confianza que siempre me han brindado. Gracias por apoyar mis sueños.

A Thimoteo, mi caballo predilecto, por ser uno de los más grandiosos regalos en mi vida y ser parte complementaria en muchas de mis decisiones. Más que un caballo, mi amigo.

.....
EFRÉN N. ALCÍVAR ARTEAGA

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día

Agradezco a Dios por bendecirme y por guiarme a lo largo de mi existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

Gracias a mis padres: Josefa y Marcos, por ser los pilares fundamentales de mis sueños, por confiar y creer en mis expectativas, por los consejos, valores y principios que me han inculcado.

A mis hermanas y hermanos, Angélica, Kathy, Miguel y Xavier, por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias.

A mis tíos, Lizandro Vera y Diana Salavarría, por que han estado conmigo en mis mejores y peores momentos, gracias por brindarme su apoyo.

A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

A los docentes de la carrera de Medicina Veterinaria, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de mi profesión, de manera personal, al Dr. Ignacio Macías Andrade, tutor del trabajo de titulación quien ha guiado con paciencia, y rectitud como docente.

A todos mis amigos y compañeros, por haber compartido todos estos años conmigo, y haberse convertido en parte de mi familia.

A los miembros del Tribunal de Tesis, Dr. Derlys Mendieta, Dr. Jofre Vera y Dra. Karolina López, por haberme guiado durante el proceso de este trabajo.

.....
MARCO V. ARTEAGA VERA

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico principalmente a Dios, por ser el inspirador y darme fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A mi padres, Josefa Vera Zambrano y Marcos Arteaga Espinoza, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, en especial a mi madre por ser el pilar fundamental en mi vida. Gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy. Ha sido un orgullo y un privilegio ser su hijo, son los mejores padres.

A mis dos tesoros, Angélica Arteaga y Kathy Arteaga, y mis hermanos, Miguel Arteaga y Xavier Arteaga, por estar siempre presentes, acompañándome y por el apoyo moral, que me brindaron a lo largo de esta etapa de mi vida.

A todas las personas que de una u otra forma me han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito, en especial a aquellos que me abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

.....
MARCO V. ARTEAGA VERA

CONTENIDO GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA	ii
CERTIFICACIÓN DE TUTOR	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA	viii
CONTENIDO GENERAL.....	ix
CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
PALABRAS CLAVE	xiii
ABSTRACT.....	xiv
KEYWORDS.....	xiv
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	4
1.3. OBJETIVOS.....	6
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	6
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
1.4. HIPÓTESIS.....	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1. OVULACIÓN.....	8
2.2. CICLO ESTRAL BOVINO	8
2.3. FASES DEL CICLO ESTRAL BOVINO.....	8
2.3.1. FASE FOLICULAR.....	9
2.3.2. FASE LUTEAL	9
2.4. FOLICULOGÉNESIS	10
2.5. DINÁMICA FOLICULAR.....	12
2.5.1 DINÁMICA FOLICULAR DURANTE EL CICLO ESTRAL.....	16
2.5.2 TASA DE CRECIMIENTO FOLICULAR	17
2.5.3 DIÁMETRO MÁXIMO DE FOLÍCULOS.....	17
2.6. RESERVA FOLICULAR.....	18

2.7. HORMONA ANTIMÜLLERIANA.....	18
2.7.1 AMH EN HEMBRAS BOVINAS.....	19
2.8. RELACIÓN ENTRE LA POBLACIÓN DE FOLÍCULOS ANTRALES (AFP) Y LOS NIVELES DE AMH.....	19
2.9. AMH COMO MARCADOR DE RESERVA OVÁRICA EN MUJERES.....	21
2.10. RESERVA FOLICULAR Y AMH.....	21
2.11. AMH Y FERTILIDAD EN BOVINOS.....	22
2.12. TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO PARA DETERMINACIÓN DE AMH (ELISA).....	24
2.13. RAZA DE GANADO BRAHMAN.....	24
2.13.1. ORIGEN DE LA RAZA DE GANADO BRAHMAN.....	24
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO.....	26
3.1. UBICACIÓN.....	26
3.2. DURACIÓN DEL TRABAJO.....	26
3.3. FACTORES EN ESTUDIO.....	26
3.4. TRATAMIENTOS.....	26
3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
3.6. VARIABLES MEDIDAS.....	27
3.6.1. VARIABLES INDEPENDIENTES.....	27
3.6.2. VARIABLES DEPENDIENTES.....	27
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
3.8. MANEJO DEL ENSAYO.....	28
3.9. MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	29
3.9.1. NÚMERO Y TAMAÑO DE FOLÍCULOS OVÁRICOS.....	29
3.9.2. TAMAÑO DE CUERPOS LÚTEOS.....	30
3.9.3. TAMAÑO DE OVARIOS.....	30
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1. ANÁLISIS EXPLORATORIO DE LOS DATOS.....	31
4.2. RELACIONES ENTRE VARIABLES.....	33
4.2.1. ANALISIS DE CORRELACIÓN.....	33
4.2.2. ANALISIS DE REGRESIÓN.....	36
4.3. ANÁLISIS DE LA VARIANZA.....	41
4.3.1. NÚMERO TOTAL DE FOLÍCULOS.....	42
4.3.2. NÚMERO DE FOLÍCULOS DE DIÁMETRO DE 2 A 4 MM.....	43

4.3.3. NÚMERO DE FOLÍCULOS DE DIÁMETROS COMPRENDIDOS ENTRE 4,1-7 MM	45
4.3.4. TAMAÑO DE OVARIOS.....	46
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	48
5.1. CONCLUSIONES	48
5.2. RECOMENDACIONES	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXOS.....	60

CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 3.1. Condiciones climáticas del Cantón Paján.....	26
Cuadro 4.1. Resumen descriptivo de las variables número total de folículos, folículos de 2-4 mm, folículos de 4,1-7 mm, folículos >7 mm, tamaño de ovarios (cm) y tamaño del cuerpo lúteo (mm) en vaquillas Brahman con diferentes rangos de la AMH.	32
Cuadro 4.2. Coeficientes de correlación de Pearson para las variables número total de folículos, folículos de 2-4 mm, folículos de 4,1-7 mm, folículos >7 mm y tamaño de los ovarios (cm) y del cuerpo lúteo (mm) en vaquillas Brahman con diferentes niveles de la AMH.	34
Cuadro 4.3. Resumen del análisis de varianza para las variables número de folículos, folículos de 2-4 mm, folículos de 4,1-7 mm, folículos >7 mm, tamaño de ovarios (cm) y tamaño del cuerpo lúteo (mm), en vaquillas Brahman con diferentes rangos de la AMH.	41
Cuadro 4.4. Resumen del análisis de varianza para el desdoblamiento de las interacciones significativas entre los rangos de edad y los rangos de la hormona para las variables número total de folículos, folículos de 2-4 mm en vaquillas Brahman con diferentes niveles de la AMH.....	42
Cuadro 4.5. Comparación entre el tamaño de los ovarios (cm) en vaquillas de edades comprendidas entre los 18-24 y 25-30 meses, por la prueba de Tukey a 5% de probabilidad.	47
Gráfico 4.1. Comportamiento del número total de folículos en función de los niveles de la AMH en vaquillas Brahman.....	36
Gráfico 4.2. Comportamiento del número de folículos de 2 – 4 mm en función de los niveles de la AMH en vaquillas Brahman.	37
Gráfico 4.3. Comportamiento del número de folículos totales en función de la edad en vaquillas Brahman.....	39
Gráfico 4.4. Desdoblamiento de la interacción rangos de edad de las vaquillas*rangos de la AMH en relación a la variable número total de folículos (barras de error corresponden al nivel crítico de Tukey al 5%).	42
Gráfico 4.5. Desdoblamiento de la interacción rangos de edad de las vaquillas*rangos de la AMH en relación a la variable número de folículos de 2 a 4 mm (barras de error corresponden al nivel crítico de Tukey al 5%)......	44
Gráfico 4.6. Desdoblamiento de la interacción los rangos de edad de las vaquillas*rangos de la AMH en relación con la variable número de folículos de 4,1 a 7 mm (barras de error corresponden al nivel crítico de Tukey al 5%).	45

RESUMEN

El ganado bovino se considera pilar fundamental en producción pecuaria, lo que hace necesario establecer nuevas biotecnologías asistidas. El objetivo fue determinar la relación entre niveles de AMH y dinámica folicular en vaquillas Brahman de diferentes edades. Se seleccionaron 20 vaquillas de 18-30 meses de edad en un diseño DCA factorial (2x3) agrupadas en tres rangos sanguíneos de AMH (100-200, 200-300 y de 300-400 pg/ml; picogramos/mililitro). En todas las vaquillas se contaron y midieron los folículos antrales, cuerpos lúteos y tamaño de ovarios. Los datos se sometieron a ADEVA, correlaciones de Pearson y de regresión; las medias y las interacciones diferentes se compararon con Tukey 5% (InfoStat 2017). Se encontró relación lineal entre los niveles de AMH y el número de folículos totales y de folículos de 2-4 mm ($P < 0,05$) y R^2 superior al 75%. Se obtuvo un ajuste cuadrático entre las edades de las vaquillas y el número total de folículos, con valor máximo de 49 folículos al alcanzar las vaquillas 23,5 meses. Se evidenció que el número de folículos totales y de folículos de 2-4 mm estuvo asociado a los mayores niveles de AMH y a las vaquillas de edades comprendidas entre 25-30 meses ($P < 0,05$); mientras que el mayor número de folículos de 4,1-7 mm estuvo asociado a los niveles de AMH de 100-200 pg/ml en edades entre 25-30 meses, lo que permite concluir que a mayores niveles de AMH existe una mayor población folicular.

PALABRAS CLAVE

Folículos ováricos, reserva ovárica, folículos antrales, cuerpo lúteo, prolificidad, eficiencia reproductiva.

ABSTRACT

Cattle are considered a fundamental pillar in livestock production, which requires establishing new assisted biotechnologies. The objective of this work was to determine the relationship between AMH levels and follicular dynamics in Brahman heifers of different ages. 20 heifers of 18-30 months of age were selected in a DCA factorial design (2x3) grouped into three blood ranges of AMH (100-200, 200-300 and 300-400 pg/ml; picograms/milliliter). In all the heifers the antral follicles, corpora lutea and size of ovaries were counted and measured. The data were submitted to ADEVA, Pearson correlations and regression; the means and the different interactions were compared with Tukey 5% (InfoStat 2017). A linear relationship was found between AMH levels and the number of total follicles and follicles of 2-4 mm ($P < 0,05$) and R^2 greater than 75%. A quadratic adjustment was obtained between the ages of the heifers and the total number of follicles, with a maximum value of 49 follicles when the heifers reached 23,5 months. It was evidenced that the number of total follicles and follicles of 2-4 mm was associated with the highest levels of AMH and heifers aged between 25-30 months ($P < 0,05$); whereas the highest number of follicles of 4,1-7 mm was associated with AMH levels of 100-200 pg/ml in ages between 25-30 months. With these findings, it was concluded that at higher levels of AMH there is a larger follicular population.

KEYWORDS

Ovarian follicles, ovarian reserve, antral follicles, corpus luteum, prolificacy, reproductive efficiency.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En la actualidad la producción de ganado bovino es una de las actividades pecuarias más importantes en la mayor parte del mundo. Las dependencias federales, estatales, instituciones de educación superior e investigación, organizaciones y asociaciones de productores, están involucradas en el desarrollo de las actividades que reconocen la importancia de los recursos genéticos pecuarios, como un componente esencial para mejorar la eficiencia productiva y la contribución al desarrollo de biotecnologías reproductivas eficaces (Conargen, 2012).

El mejoramiento genético ha sido regente del esfuerzo por mejorar la productividad del ganado de carne y de leche. No obstante, el éxito de la mejoría genética está estrechamente relacionado con un desempeño reproductivo eficiente, que depende del desarrollo folicular del ovario y de la calidad de los ovocitos. En ganado bovino, últimamente se han propuesto varios tratamientos para manipular el crecimiento de los folículos ováricos. Estas manipulaciones hormonales han sido utilizadas con éxito para optimizar los resultados reproductivos con la aplicación de diferentes biotecnologías (Baruselli *et al.*, 2015).

En investigaciones realizadas por Baruselli *et al.* (2015), se analiza información reciente sobre la población folicular antral (AFP) y su asociación con la AMH, y la posibilidad de utilizar la AMH como marcador en las tecnologías reproductivas y en última instancia para mejorar la fertilidad del ganado bovino.

En consecuencia, Baruselli *et al.* (2015), han determinado que los niveles circulantes de AMH se encuentran asociados con la AFP y, de ese modo, se ha identificado esta hormona como un importante marcador de la respuesta endocrina principalmente a la superovulación y la producción de embriones *in vitro* en bovinos. Por otra parte, una serie de publicaciones recientes y los estudios en curso están tratando de determinar si los niveles circulantes de AMH se correlacionan con la fertilidad y con otros aspectos reproductivos.

Díaz *et al.* (2013) confirman que, la AMH es un miembro de la superfamilia del TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), especialmente conocida por su acción en la diferenciación sexual del feto macho. Este factor local también es producido por las células de la granulosa de los folículos ováricos, principalmente en preantrales y antrales tempranos, ejerciendo una inhibición local sobre la activación y crecimiento de folículos en fases tempranas de diferenciación. Así mismo, la AMH reduce la respuesta a FSH de los folículos preantrales y antrales pequeños y de este modo, podría ejercer un rol negativo en el reclutamiento cíclico y en el proceso de selección del folículo dominante.

De esta forma, Souza *et al.* (2015), reportan que el descubrimiento y comportamiento de esta hormona puede ser una nueva alternativa en la eficiencia de la reproducción animal, debido a su similitud de acción en la especie estudiada (humano) y determinar aquellos individuos con mayor prolificidad.

Por otro lado, Fair *et al.* (1997), describe que, en bovinos la unidad funcional del ovario es el folículo y se compone de un ovocito en desarrollo rodeado por una o varias capas de células somáticas, que son el sitio de acción y síntesis de gran número de hormonas y factores de crecimiento que promueven y regulan el desarrollo folicular. Por consiguiente, el estudio de la dinámica folicular y por ende su población folicular, aportan información importante para la comprensión de la relación entre dinámica folicular y los niveles de AMH. Ireland *et al.* (2008), corrobora que, en el ganado bovino, el número de folículos (específicamente folículos antrales) en los ovarios refleja el tamaño de la reserva ovárica.

Investigaciones extensivas en vacas muestran una alta relación significativa entre la AMH y la población folicular; análisis seriados de AMH en vacas con población baja, media y elevada de folículos antrales muestran que la variación día a día en el AMH periférica no es significativa. Sin embargo, las concentraciones relativamente estáticas de esta hormona indican que un análisis simple durante el ciclo estral puede ser usado como un predictor válido de la población folicular y por lo tanto de la respuesta superovulatoria (Murphy, 2011).

Jimenez-Krassel *et al.* (2015), probaron la hipótesis de que las vaquillas con las concentraciones más bajas de AMH tienen una fertilidad subóptima y son

descartadas de la manada por un rendimiento reproductivo deficiente a una tasa mayor, y por lo tanto tienen una vida productiva más corta en comparación con las manadas de la misma edad con AMH más alta. Por tanto, concluyeron que la determinación de la concentración de AMH en vaquillas adultas jóvenes podría ser un método de diagnóstico simple para predecir la longevidad de la manada (también la fertilidad, Mossa *et al.*, 2017), y usar la AMH como un marcador fenotípico para mejorar la longevidad.

Por lo antes expuesto se plantea la siguiente interrogante: ¿Los niveles de AMH influirán sobre la dinámica folicular en vaquillas Brahman?

1.2. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con lo reportado por Durlinger *et al.* (2002), la AMH en hembras bovinas es producida por células de la granulosa, principalmente de folículos preantrales y antrales prematuros. En este argumento, se ha correlacionado la AMH con la población folicular antral en el ganado de diferentes categorías y grupos genéticos (Batista *et al.*, 2014b; Batista *et al.*, 2015).

Por otra parte, parece que los niveles plasmáticos de AMH varían significativamente entre razas de ganado siguiendo el patrón en términos de población folicular antral y dinámica folicular (Ribeiro *et al.*, 2014). Asimismo, parece que hay un umbral para los niveles de AMH diferente para grupos genéticos diferentes cuando se trata de clasificar a los animales en clases según su población folicular antral (Guerreiro *et al.*, 2014). Por ejemplo, cuando las vaquillas dentro de un grupo genético se clasificaron como con una baja o alta población folicular antral, el umbral de la AMH para dividir en clases las vacas *Bos indicus* fue mayor en comparación con ese mismo umbral en vaquillas *Bos taurus* (Batista *et al.*, 2014b).

Una ventaja complementaria de esta investigación es que, se analiza la posibilidad de utilizar la AMH en lugar del conteo directo de folículos con ultrasonido para predecir la población folicular antral, ya que los niveles de AMH mínimamente varían durante todo el ciclo estral (Rico *et al.*, 2009; Ireland *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2015a). Por lo tanto, las muestras de sangre se pueden tomar en cualquier momento de este para evaluar niveles plasmáticos de AMH (Batista *et al.*, 2014b). De esta forma, se pueden correlacionar la dinámica folicular con los niveles séricos de AMH, y consecuentemente utilizar esta hormona como herramienta de biotecnología reproductiva.

La única excepción sería el periodo después de tratamientos de superestimulación con FSH, debido que, al parecer los niveles plasmáticos de AMH son mayores que los niveles fisiológicos normales. Se considera que este aumento en los niveles plasmáticos de AMH después del tratamiento con FSH puede ser debido al crecimiento de folículos pequeños que no fueron detectados por ecografía. Por otra parte, no se puede descartar la posibilidad de que el

tratamiento con FSH puede haber aumento de la secreción de AMH por las células de la granulosa. Sin embargo, esta hipótesis requiere mayor investigación (Rico *et al.*, 2009; Rico *et al.*, 2012).

En este contexto, a través de la evaluación de los niveles de AMH sobre la dinámica folicular y por ende su población folicular en vaquillas Brahman, la presente tesis pretende analizar y comparar información reciente sobre la población folicular y su asociación a la AMH; además de determinar la posibilidad de utilizar la AMH como marcador reproductivo en las tecnologías asistidas. Teóricamente, también se procura estudiar algunas peculiaridades en la raza de ganado Brahman, las etapas del ciclo estral, la dinámica folicular y la población de folículos antrales, información que está estrechamente asociados con la AMH.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles de AMH sobre la dinámica folicular en vaquillas Brahman.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Asociar los diámetros de los folículos de las vaquillas con los niveles de AMH en rangos (100-200, 200-300 y 300-400 pg/ml).

Determinar la relación entre la edad de las vaquillas comparados con los niveles de la AMH.

1.4. HIPÓTESIS

Existe correlación positiva entre los niveles de AMH y la población folicular en vaquillas Brahman de entre 18-30 meses de edad.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. OVULACIÓN

La ovulación como la ruptura de la pared del folículo y expulsión del ovocito rodeado por las células de la corona radiada. El folículo se colapsa y queda ocupado por células sanguíneas procedentes de la ruptura de pequeños vasos. Las células de la granulosa y las de la teca interna proliferan y llegan a ocupar el lugar del coágulo. Estas células son capaces de segregar progesterona, hormona que protegerá al ovocito y actuará sobre la mucosa uterina, preparándola para la implantación en el caso de que exista fecundación, se denomina entonces cuerpo lúteo (Climent *et al.*, 2012).

Las células del trofoblasto producen una hormona, la luteotropina, capaz de mantener el cuerpo lúteo en el caso de que haya ocurrido la fecundación. Si no ha sido así, el cuerpo lúteo es transitorio y al cabo de unos días degenera y se convierte en una cicatriz fibrosa blanquecina, el corpus albicans (Climent *et al.*, 2012).

2.2. CICLO ESTRAL BOVINO

Adams (1998), citado por Tríbulo (2015), define que, la vaca es un animal poliéstrico anual (cicla todo el año), y el ciclo estral se define como el período de tiempo entre la ocurrencia de un estro a otro. El ciclo estral está formado por ondas de desarrollo folicular y se han descritos ciclos estrales con dos, tres y hasta cuatro ondas de desarrollo folicular. Normalmente, se expresa que el ciclo estral tiene una duración de aproximadamente 21 días con un rango que va de 17 a 24 días (Ginther *et al.*, 1989; Adams *et al.*, 1994, citados por Tríbulo, 2015).

2.3. FASES DEL CICLO ESTRAL BOVINO

Para Rathbone *et al.* (2001), es esencial comprender a fondo los cambios endocrinos y funcionales junto con el comportamiento reproductivo de los animales. Por eso, corrobora que, el ciclo estral en bovinos se divide en cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro.

Donde el proestro es el periodo que precede al estro y está caracterizado por la regresión del cuerpo lúteo (CL) del ciclo estral anterior (duración media, 2 días);

el estro, se comprende como el periodo en el cual la hembra es receptiva al apareamiento (duración de 6 a 18 horas), y la ovulación tiene lugar 28 horas después del inicio del estro aproximadamente, seguido por el desarrollo de un CL en el lugar donde se produjo la ovulación (Rathbone *et al.*, 2001).

Adams *et al.* (2008), por su parte ratifican que, el metaestro se inicia de inmediato, justo después de la interrupción del celo y se caracteriza por el desarrollo temprano del CL (con una duración media, 3 días). Y finalmente, en el periodo de diestro el CL está completamente desarrollado y activo, y puede durar hasta 15-17 días en ausencia de preñez, o el CL se puede mantener hasta el parto si la hembra queda preñada.

2.3.1. FASE FOLICULAR

Esta etapa, cuya duración por lo general es de tres días, empieza con la luteólisis y termina con la manifestación del celo. Schams (1987), reporta que en la luteólisis las concentraciones de progesterona en sangre decaen abruptamente a niveles menores a 1 ng/ml, siendo de esta manera la PGF₂ α de origen uterino el principal agente luteolítico en los animales domésticos. La caída de estas concentraciones de progesterona elimina el feed back negativo sobre la secreción de gonadotrofinas, por lo que aumenta la frecuencia de los pulsos de LH y, en menor grado, la de FSH.

El desarrollo del folículo dominante, el cual secreta cantidades crecientes de estradiol, es estimulado por el aumento de la pulsatilidad de LH. El grado de desarrollo folicular al momento de la luteólisis determina el tiempo que transcurre hasta que un folículo completa su crecimiento y es capaz de producir cantidades suficientes de estradiol como para iniciar el celo o estro y la descarga preovulatoria de LH (Ireland, 1987).

2.3.2. FASE LUTEAL

Luego de la ovulación, comienza a formarse el cuerpo lúteo gracias a la invasión por parte de células que proliferan de la capa de la granulosa y de la teca (Rathbone *et al.*, 2001).

Las células de la teca se convierten en células luteales pequeñas y las células de la granulosa se convierten en células luteales de mayor tamaño. Las células luteales pequeñas contribuyen con aproximadamente el 15% de la progesterona secretada por el CL, mientras que el resto es derivado de las células luteales grandes. Sin embargo, las células grandes poseen casi todos los receptores para PGE2 y PGF2 α (Braden *et al.*, 1988).

A su vez, las concentraciones de progesterona comienzan a elevarse en los días 3-4, alcanzando un pico entre los días 8 y 12, y luego disminuyen hasta concentraciones basales antes del próximo estro, como respuesta a la secreción uterina de PGF2 α y en ausencia de un embrión viable en el útero (Adams *et al.*, 2008).

2.4. FOLICULOGÉNESIS

Gougeon (1996), ratifica que, en el ovario adulto la foliculogénesis comienza cuando los folículos dejan el grupo de folículos en reposo para ingresar a la fase de crecimiento. Desde allí, el folículo en crecimiento temprano experimenta un proceso de desarrollo que incluye un curso dramático de proliferación y diferenciación celular. Por tanto, la foliculogénesis se considera como el proceso por el cual un folículo primordial se desarrolla hasta folículo pre-ovulatorio, acompañando el crecimiento y la diferenciación del ovocito y de las capas de células de la granulosa.

Por otro lado, Lundy *et al.* (1999); Rajesh (2007), citados por Tribulo (2015), coinciden en el concepto de que el proceso de crecimiento y diferenciación folicular es continuo, pero a su vez irreversible. Los folículos pueden ser clasificados en primarios, secundarios, terciarios o antrales y de Graff o preovulatorios, de acuerdo con el número de capas de células de la granulosa que rodean al ovocito, diámetro del ovocito, presencia o ausencia del antro.

Lussier *et al.* (1987), reportan que muy pocos folículos llegan a la ovulación, debido a que cuando un folículo entra en el grupo de crecimiento la gran mayoría se degenera por atresia (99% o más de los folículos). Singh *et al.* (2004); Evans *et al.* (2010); Ireland *et al.* (2011), demostraron que el número de folículos ≥ 3 mm de diámetro reclutado en cada onda se puede contar (cantidad de folículos

antrales) en diferentes días del ciclo estral en vacas y vaquillas para carne y leche.

En un estudio realizado por Lussier *et al.* (1987), sobre las tasas de crecimiento en el ovario de la vaca, se reportó que, el diámetro promedio de los 5 folículos más pequeños con un antro discreto por ovario fue de 0,14 mm, todos los folículos mayores a 0,29 mm tenían un antro. De los 1236 folículos observados (clase 2), el 36% tenía un antro discreto. Los folículos no antrales y antrales de la misma clase, tenían un diámetro promedio de 0,17 y 0,21 mm, respectivamente.

Se requeriría aproximadamente un periodo equivalente a dos ciclos de celo para que un folículo crezca desde la formación del antro hasta el tamaño preovulatorio. El crecimiento folicular es lento en los folículos antrales pequeños, pero aumenta en los folículos de 0,68-3,67 mm (Lussier, *et al.*, 1987).

Ireland (1987), corrobora que, durante la foliculogénesis, un grupo de folículos pre-antrales en crecimiento responde y depende de las gonadotropinas, para su crecimiento y diferenciación continuos. Sin embargo, la mayoría de estos folículos sufren atresia. Los mecanismos que dan como resultado la supervivencia de un número de folículos ovulatorios (dominantes) parecen depender de: la capacidad de respuesta de los folículos pre-antrales a las gonadotropinas, los factores inhibitorios y estimulantes de un folículo dominante, y la retroalimentación entre el folículo dominante y la glándula pituitaria.

Las etapas iniciales de la foliculogénesis ocurren independientemente de las hormonas gonadotróficas. Los folículos antrales inicialmente responden y luego dependen de la FSH. Hay incrementos transitorios continuos en la FSH en el ganado bovino durante el ciclo estral y el anestro (Roche, 1996).

Durante la fase folicular del ciclo estral en la vaca, hay una rotación rápida en los folículos grandes (tamaño ovulatorio), siendo el folículo ovulatorio identificable por tamaño no más de 3 días antes del estro. Las características del folículo ovulatorio se han descrito en términos de producción de esteroides y, en menor medida, de receptores de gonadotropina (Staigmiller y England, 1982).

2.5. DINÁMICA FOLICULAR

La dinámica folicular en el ovario, se ha estudiado a través de varias técnicas, manteniendo la ultrasonografía y la medición de niveles hormonales como las más aplicadas, donde se muestran variaciones que dependen de la genética, el estado fisiológico del animal, el clima, la nutrición o el sistema de producción. La dinámica folicular, se estudia principalmente para mejorar el conocimiento de los principios fisiológicos que rigen la producción de ovocitos y de hormonas ováricas y su relación con el comportamiento reproductivo del bovino (Henaó, 2010).

Henaó (2010), reafirma que, el desarrollo folicular bovino durante un ciclo estral normal, está caracterizado por un crecimiento en forma de ondas con presencia de dos a cinco cohortes foliculares por ciclo, de las cuales solo un folículo se torna ovulatorio, demostrándose, además, que el crecimiento folicular en forma de ondas también se produce durante el período prepuberal, puberal, primer tercio de la gestación y período de anestro posparto.

Aunque se ha determinado que existe mucha similitud en el patrón fundamental del desarrollo de ondas foliculares entre *Bos taurus* y *Bos indicus*, también se han reportado diferencias en la dinámica folicular que pueden afectar el comportamiento reproductivo y la aplicación de biotecnologías reproductivas. La dinámica folicular puede variar por efectos ambientales y estados fisiológicos, que impiden establecer un patrón específico de dinámica folicular para cada raza y etapa fisiológica (Henaó, 2010).

Anteriormente se habían realizado pocos estudios con ovarios seccionados en serie para caracterizar el desarrollo folicular ovárico durante el ciclo estral bovino, probablemente debido a las limitaciones presentes en esa época. El primer y más extenso estudio fue publicado por Rajakoski (1960), quien, basándose en ilustraciones anatómicas e histológicas, propuso la teoría de crecimiento folicular en forma de ondas con la ocurrencia de dos ondas foliculares durante el ciclo estral bovino.

Por muchos años esta teoría fue puesta en duda por investigaciones que demostraban resultados contradictorios sobre la naturaleza del crecimiento folicular. Hasta cuando Pearson y Ginther (1984), realizaron el primer estudio ultrasonográfico de ovarios bovinos, donde monitorearon los ovarios de cinco vaquillas diariamente hasta que todas las vaquillas fueron examinadas por un período de tres días antes de una ovulación a tres días después de la siguiente ovulación, determinando la presencia de ondas foliculares durante el ciclo estral.

Esta hipótesis también fue reafirmada por Borges *et al.* (2001), en un estudio acerca del crecimiento folicular ovárico que se realizó en vaquillas mestizas Holandés-Cebú por medio de seguimiento ultrasonográfico, detectándose predominancia de ciclos con tres ondas de crecimiento folicular (58,3%) sobre ciclos con dos ondas (33,3%). Además, determinaron que durante cada onda de crecimiento folicular existe una población de folículos pequeños, medianos y grandes en cada ovario, de los cuáles uno se torna dominante.

De acuerdo con Forde *et al.* (2011), el crecimiento, desarrollo y maduración de los folículos ováricos es un proceso primordial para la alta eficiencia reproductiva en animales de granja. Durante el ciclo hay generalmente dos (vacas lecheras) o tres (vaquillas y vacas) ondas de crecimiento de folículos ováricos. El crecimiento del folículo consiste en un período de aparición de una cohorte de folículos (patrón que se denomina como ondas de crecimiento folicular), selección de un folículo dominante y atresia u ovulación del folículo dominante.

Webb *et al.* (2004), reporta que, la regulación de la actividad ovárica es un proceso integrado que abarca tanto señales extraováricas como factores intrafoliculares. Demarcando que, el inicio del crecimiento del folículo primordial y las etapas tempranas de la foliculogénesis pueden ocurrir sin o con gonadotropinas. Generalmente, los folículos reclutados expresan un rango de ARNm que codifica enzimas esteroideogénicas, receptores de gonadotropinas y factores reguladores locales y sus receptores.

Factores de crecimiento producidos localmente, como el IGF y miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante-beta, trabajan en conjunto con gonadotropinas a lo largo del crecimiento folicular. Durante el desarrollo fetal

se establece un número fijo de folículos primordiales, el crecimiento de un folículo ovárico toma un período de 3-4 meses y se categoriza como estadio gonadotrofina independiente y gonadotrofina dependiente. Por lo tanto, los roles de los factores de crecimiento en el desarrollo folicular y la supervivencia dependen del estado de gonadotropina y del estado de diferenciación del folículo (Webb *et al.*, 2004).

Gigli *et al.* (2006), revalidan que la onda folicular se considera como la activación y crecimiento simultáneo de un grupo de folículos terciarios que emergen, continuando uno de ellos su crecimiento y diferenciación (folículo dominante) mientras que los otros (folículos subordinados), se atresian.

Fricke (2001), propone que, la emergencia del grupo o cohorte de pequeños folículos antrales inicia justo antes del día de la ovulación y durante los próximos días, donde el folículo que se hace dominante suprime el crecimiento de una nueva onda folicular. Mientras que el folículo dominante continúa aumentando de tamaño, el crecimiento de los restantes folículos de la cohorte cesa o se hace lento y estos folículos subordinados finalmente sufren atresia.

Por otro lado, Figueiredo *et al.* (1997); Pinheiro *et al.* (1998) y Baruselli *et al.* (2007), citados por Motta (2011), reportaron que existen diferencias en la dinámica folicular entre *Bos taurus taurus* (taurino) y *Bos taurus indicus* (cebuíno), particularidad observada en el número de ondas de crecimiento folicular por ciclo estral, capacidad de secretar LH, área del tejido luteal, diámetro folicular en el momento de la divergencia y en la ovulación.

Es así como, Figueiredo *et al.* (1997), reportaron en un estudio realizado en vacas y vaquillas *Bos taurus indicus*, que la dinámica folicular es caracterizada por la presencia de dos ondas en vacas (83,3%) y tres ondas en vaquillas (64,7%), reportando de manera general, hasta cuatro ondas por ciclo en ganado Brahman, Neloré y Gyr.

Por otra parte, Sirois y Fortune (1988), reportaron la presencia de dos, tres o cuatro ondas de crecimiento folicular por ciclo. Cada onda se caracterizó por el desarrollo de un folículo grande (dominante) y un número variable de folículos

más pequeños (no dominantes). Ginther *et al.* (1989) y Wolfenson *et al.* (2004), refieren que en animales *Bos taurus taurus* predominan de dos a tres ondas por ciclo estral.

Figueiredo *et al.* (1997), demostraron además que, aunque el folículo dominante y el cuerpo lúteo son más pequeños que en las razas europeas, la dinámica folicular en el ganado Neloré fue similar a la observada en las razas europeas y se caracterizó por 2 o 3 ondas foliculares para vacas y vaquillas, respectivamente.

Gigli *et al.* (2006), en su trabajo de revisiones bibliográficas corrobora que, por ultrasonografía transrectal, se demostró que las ondas se desarrollan al azar en los dos ovarios, salvo en la preñez y el posparto temprano en donde la presencia del cuerpo lúteo de preñez determina el reclutamiento solamente en el ovario contralateral.

El número de ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral es determinado por la amplitud de la fase luteal; si la progesterona declina mientras el folículo dominante de la segunda onda está en la fase de crecimiento posdesviación o en su fase estática temprana (3–4 días después de su desarrollo máximo) este folículo ovulará; sino sufrirá atresia y se originará una nueva onda (Gigli *et al.*, 2006).

Para Gigli *et al.* (2006), cada onda folicular recluta entre 5 a 20 folículos, los cuales han adquirido competencia meiótica a través de un pico secundario de FSH que necesita un umbral de concentración que varía entre animales y folículos. En los ciclos estrales donde se desarrollan dos o tres ondas, la emergencia de la primera onda folicular, ocurre generalmente alrededor del día de la ovulación.

Así mismo, Gigli *et al.* (2006), corrobora que la emergencia de la segunda onda ocurre en el día 9 a 10 para los ciclos de dos ondas y el día 8 a 9 para los de tres ondas. En los ciclos de tres ondas, la tercera onda emerge entre los días 15 a 16.

2.5.1 DINÁMICA FOLICULAR DURANTE EL CICLO ESTRAL

En un estudio realizado por Roa *et al.* (2006), sobre la dinámica ovárica en vacas Brahman y Mestizas (*Bos indicus* x *Bos taurus*), se demostró que, durante un ciclo estral las vacas de la raza Brahman pueden desarrollar una (6,7%), dos (90,0%) o tres (3,3%) ondas foliculares (OFs), así mismo, se demostró que, la dinámica folicular en ambas razas se caracterizó por una mayor frecuencia de ciclos con dos ondas.

En un estudio realizado en ganado de la raza Gyr por Moreira *et al.* (2000), se observaron ciclos con dos (6,67%), tres (60,00%), cuatro (26,67%) y cinco (6,67%) ondas foliculares, demostrando de esta manera la variación en el número de ondas foliculares. Perea *et al.* (1998), reportaron en vacas Cebú mestizas que durante su primer ciclo estral posparto, el 16,5% experimentó una onda de crecimiento folicular, el 67% dos ondas y otro 16,5% tres OFs por ciclo, observándose en cada caso las tres fases de crecimiento folicular.

De acuerdo con Moreira *et al.* (2000), la primera onda folicular de vacas Gyr emergió el día $1,2 \pm 0,5$ del ciclo, la segunda el día $7,2 \pm 0,9$; la tercera el día $11,2 \pm 0,9$ y la cuarta el día $15 \pm 1,4$. Figueiredo *et al.* (1997), reportan que, en vacas Nelore que presentaron tres OFs, la emergencia de la primera, segunda y tercera ondas ocurrió los días $1,5 \pm 0,2$, $9,1 \pm 0,4$ y $15,1 \pm 0,4$ del ciclo. En la raza Gyr la divergencia entre el FD y el FS de la primera, segunda, tercera y cuarta ondas, fue observada los días $5,7 \pm 1,7$; $10,2 \pm 0,9$; $14,7 \pm 0,9$ y $18,7 \pm 1,2$ del ciclo, respectivamente.

Roa *et al.* (2006), reportan que la duración del ciclo estral para vacas Brahman y Mestizas, fue de $20,6 \pm 0,5$; $22,3 \pm 2,2$ y $27,0 \pm 1,5$ días, respectivamente; mientras que Figueiredo *et al.*, 1997) ratifican que en vacas Nelore que desarrollaron dos y tres ondas por ciclo estral, su duración fue de $20,6 \pm 0,4$ y $22,0 \pm 0,4$ días, respectivamente.

En vacas de la raza Guzerat con tres OFs, de $19,8 \pm 2,4$ días. El seguimiento ultrasonográfico ovárico durante el primer ciclo estral posparto de vacas Cebú mestizas determinó la duración del ciclo estral en 14, 20 y 23 días para hembras que desarrollaron una, dos o tres OFs por ciclo, respectivamente (Perea *et al.*,

1998). Algunas vacas con dos o tres ondas de crecimiento folicular por ciclo presentan similar duración del ciclo estral, lo que indica que otros factores diferentes a la vida media del cuerpo lúteo pueden determinar la duración del ciclo estral en ganado *Bos indicus*.

2.5.2 TASA DE CRECIMIENTO FOLICULAR

La tasa de crecimiento de los folículos dominantes (FDs), en vacas Brahman en clima tropical seco fue de $0,9\pm 0,2$ mm/día (Henao, Olivera y Maldonado, 2000); mientras que en vacas Guzerat la tasa de crecimiento para los FDs de la primera, segunda y tercera OFs fue de $1,3\pm 0,09$; $0,8\pm 0,08$ y $1,0\pm 0,1$ mm/día, respectivamente, con una diferencia entre la tasa de crecimiento de las ondas ovulatorias de los ciclos de dos y tres ondas (Coutinho *et al.*, 2007), similar a la de vacas Nelore, $0,8\pm 0,1$; $0,7\pm 0,08$ y $1,0\pm 0,07$ mm/día (Figueiredo *et al.*, 1997) y Gyr $1,0\pm 0,2$; $1,0\pm 0,2$ y $1,0\pm 0,2$ (Moreira *et al.*, 2000).

2.5.3 DIÁMETRO MÁXIMO DE FOLÍCULOS

El diámetro máximo de los folículos dominantes en el ganado *B. indicus* es menor que el que se presenta en *Bos taurus* y esto parece obedecer a una respuesta genética. En un estudio realizado por Rhodes *et al.* (1995), sobre la dinámica folicular de vacas Brahman, se desarrollaron folículos dominantes con un diámetro máximo de $10,2\pm 0,1$ mm, en promedio $2,2\pm 0,09$ días después de la ovulación previa, sin que se detecten diferencias entre los ciclos de celo con diferentes números de folículos dominantes.

En otro estudio realizado por Figueiredo *et al.* (1997), se reporta que la dinámica folicular en las vacas y vaquillas Nelore se caracterizaron por 2 o 3 ondas foliculares; y el diámetro máximo del folículo ovulatorio ($11,6\pm 0,2$ mm) fue mayor que el de la primera y segunda onda ($10,4\pm 0,2$ y $9,3\pm 0,3$ mm, respectivamente); en las que desarrollan dos ondas el FD de la segunda alcanzó mayor diámetro ($12,0\pm 0,2$ mm) que el de la primera ($11,3\pm 0,3$ mm); una talla similar, alcanzaron los FDs de vacas Gyr (Moreira *et al.*, 2000) y Nelore (Carvalho *et al.*, 2008).

De Ondiz *et al.* (2002), en un artículo detallado sobre la evaluación ultrasonográfica del crecimiento del folículo ovulatorio en vacas anéstricas mestizas Cebú, reporta que el diámetro máximo del FD fue de $11,7\pm 2,4$ mm.

Finalmente, Moreira *et al.* (2000) reportaron el diámetro máximo alcanzado en vacas Gyr ($7,2\pm 0,7$ mm), similar a los de vacas Nelore (Figueiredo *et al.*, 1997) y Brahman (Henao *et al.*, 2000; Henao *et al.*, 2002).

2.6. RESERVA FOLICULAR

Se comprende como reserva folicular a la cantidad de folículos primordiales que contienen los ovarios de un mamífero al nacer. Entre hembras mamíferas de la misma especie, el número de folículos en la reserva puede variar ampliamente. El número total de ovocitos identificables varía desde cerca de 10.000 hasta 350.000 en terneras recién nacidas. Esta reducción dramática de ovogonias resulta principalmente de la degeneración de los gametos que no pasan a ser folículos primordiales. La reserva también es reducida por la pérdida por apoptosis de los folículos primordiales durante la vida embrionaria (Murphy, 2011).

Murphy (2011), reafirma que la reserva folicular es dinámica, ya que su población de folículos primordiales sufre un agotamiento no solo en la vida fetal, sino también a través de la vida reproductiva de un individuo mamífero. Dos procesos complementarios son responsables por la pérdida de folículos primordiales.

El primero de estos, es la continua degeneración apoptótica de los ovocitos, seguido por la muerte de las células de la granulosa que los recubren. La segunda fuente de la reducción en la reserva folicular es la activación del folículo primordial, un proceso que les provoca la entrada irreversible dentro del pool de crecimiento de folículos en el ovario (Murphy, 2011).

2.7. HORMONA ANTIMÜLLERIANA

Mossa e Ireland (2018), consideran que la AMH es una glicoproteína producida por las células de la granulosa de los folículos ováricos en crecimiento y sanos en las hembras y sus receptores se expresan en las células de los ovocitos, la granulosa y la teca. Sus funciones conocidas son: la inhibición del crecimiento folicular primordial de la reserva ovárica, evitando su agotamiento prematuro y la modulación del desarrollo folicular.

Las concentraciones circulantes de AMH son relativamente constantes durante el ciclo estral y son repetibles en múltiples ciclos en mujeres y ganado, por lo que las concentraciones de AMH se pueden medir de manera confiable con una sola muestra de sangre. Debido a que la AMH se correlaciona con el tamaño de la reserva ovárica, puede usarse para predecir la fertilidad, la longevidad reproductiva y la respuesta a tratamientos antirretrovirales (Mossa e Ireland, 2018).

2.7.1 AMH EN HEMBRAS BOVINAS

Durlinger *et al.* (2002), ha reportado que la AMH, en hembras es producida a nivel ovárico por las células de la granulosa, principalmente de folículos preantrales y antrales tempranos. En este argumento, la AMH se han correlacionado con la población folicular antral en el ganado de diferentes categorías y grupos genéticos (Batista *et al.*, 2014b; Batista *et al.*, 2015).

De acuerdo con Batista *et al.* (2014b) y Ribeiro *et al.* (2014), los niveles plasmáticos de AMH, varían significativamente entre razas de ganado siguiendo el patrón en términos de AFP; y de acuerdo a lo reportado por Guerreiro *et al.* (2014), parece que hay un umbral para AMH diferente para grupos genéticos diferentes cuando se trata de clasificar a los animales en clases según su AFP.

Por ejemplo, cuando las vaquillas dentro de un grupo genético se clasificaron como con una baja o alta población folicular antral, el umbral de la AMH para dividir en clases las vacas *Bos indicus* fue mayor en comparación con ese mismo umbral en vaquillas *Bos taurus* (Batista *et al.*, 2014b).

2.8. RELACIÓN ENTRE LA POBLACIÓN DE FOLÍCULOS ANTRALES (AFP) Y LOS NIVELES DE AMH

La evaluación de la población folicular ovárica (AFP) por conteo o por medio de marcadores endócrinos, puede ser herramientas útiles para predecir el éxito de biotecnologías reproductivas en el ganado. No obstante, la población folicular antral parece ser en gran medida variable de distintos individuos. Por lo tanto, los métodos de laboratorio que puedan predecir de manera confiable la AFP podrían tener un valor significativo para seleccionar vacas donantes para la biotecnología reproductiva, y también, para aplicar la selección genómica para

identificar a los animales con mayor potencial reproductivo (Baruselli *et al.*, 2015).

En consecuencia, Baruselli *et al.* (2015), han determinado que los niveles circulantes de AMH se encuentran asociados con la AFP y, de ese modo, se ha identificado esta hormona como un importante marcador de la respuesta endocrina a la superovulación y la producción de embriones *in vitro* en bovinos. Por otra parte, una serie de publicaciones recientes y los estudios en curso están tratando de determinar si los niveles circulantes de AMH se correlacionan con la fertilidad.

Rico *et al.* (2009); Ireland *et al.* (2010); Batista *et al.* (2014b) y Souza *et al.* (2015a), refieren que una de las ventajas prácticas de la utilización de AMH sobre el conteo directo de folículos con ultrasonido para predecir la AFP, es que los niveles de AMH varían mínimamente durante el ciclo estral; por lo tanto, en cualquier momento del ciclo se pueden tomar las muestras de sangre para evaluar niveles plasmáticos de AMH.

La participación de la AMH en los mecanismos que inhiben la activación de folículos primordiales, por lo cual estos no entran en el grupo que participa en la emergencia de la onda folicular, es otro aspecto biológico intrigante de la AMH en el ciclo reproductivo de las hembras (Durlinger *et al.*, 2002, Fortune *et al.*, 2010).

Consecuentemente, parece que la AMH evita el agotamiento prematuro de la población folicular en el ovario. Pero, paradójicamente, porque la AMH es secretada principalmente por los folículos antrales tempranos, los niveles plasmáticos de AMH disminuyen en paralelo con el número de folículos ováricos a medida que los roedores (Kevenaar *et al.*, 2006) y mujeres (Piltonen *et al.*, 2005), envejecen. Siguiendo en esta línea, en un estudio reciente realizado por Batista *et al.* (2015), se ha encontrado mayores niveles plasmáticos de AMH en terneras en comparación con vaquillas que ya están ciclando en ganado *Bos indicus* y *Bos taurus*.

2.9. AMH COMO MARCADOR DE RESERVA OVÁRICA EN MUJERES

Para Ávila *et al.* (2018), la infertilidad es una condición médica que afecta del 3% al 15% de las parejas, condicionándolas a requerir un tratamiento de reproducción asistida. La AMH es el principal marcador sérico de reserva ovárica y se encuentra directamente relacionada con la cantidad y calidad de ovocitos.

En una investigación realizada por Ávila *et al.* (2018), donde se tuvo como objetivo establecer la relación entre las concentraciones séricas de AMH con el número de ovocitos capturados en procedimientos de reproducción asistida, se observó una correlación lineal positiva entre los niveles de AMH y la cantidad de ovocitos en todas las pacientes ($\rho = 0.61$, $p < 0.001$), así como con el recuento folicular antral ($\rho = 0.70$, $p < 0.001$) y la cantidad de ovocitos maduros ($\rho = 0.45$, $p < 0.0001$).

La correlación entre los niveles de AMH y la cantidad de ovocitos fue positiva en las pacientes sin SOP Y FOP ($\rho = 0.59$, $p < 0.001$). La correlación entre los niveles de AMH y la edad de las pacientes fue baja ($\rho = 0.08$, $p = 0.39$), pero moderada en pacientes mayores de 40 años. No se encontró una asociación entre las pacientes menores de 40 años y los niveles de AMH (1.9 RIQ 1.07-3.32 versus 1.72 RIQ 1.03 – 3.01, $p = 0.64$).

En pacientes menores de 40 años, la mediana de ovocitos fue menor en aquellas mujeres con niveles de AMH de 1.2 o menor (Mediana 3 RIQ 2 – 4 versus Mediana 6 RIQ 4 – 9, $p < 0.001$). En las pacientes mayores de 40 años no se encontraron diferencias (Mediana 3 RIQ 2 – 3 versus Mediana 4 RIQ 2 – 9, $p = 0.15$).

Lo que llevo a concluir que, la AMH es el marcador sérico con más evidencia clínica de correlación con la respuesta ovárica en un tratamiento de fertilidad, sin embargo, el valor de la AMH tiene que ser evaluado en el contexto de la edad de la mujer, ya que se demostró que en pacientes mayores de 40 años la correlación entre AMH y cantidad de ovocitos es baja (Ávila *et al.*, 2018).

2.10. RESERVA FOLICULAR Y AMH

La AMH es la candidata más promisoría para proveer una correlación predictiva con las poblaciones de folículos primordiales y en crecimiento. Esta hormona es conocida por estar presente en el ovario fetal y en el adulto, y recientemente identificado como un factor de crecimiento intra-ovárico en las células de la granulosa de los folículos pre antrales (Murphy, 2011).

Las concentraciones circulantes de AMH en el ratón, se correlacionan positivamente con el número de folículos y ovocitos, y disminuye con la reducción de la reserva de folículos primordiales. En humanos, hay una fuerte correlación entre AMH circulante y los folículos primordiales, así como con los folículos antrales en el ovario.

Amplias investigaciones en vacas muestran una alta relación significativa entre la AMH y la población folicular; análisis seriados de AMH en vacas con población baja, media y elevada de folículos antrales muestran que la variación día a día en el AMH periférico no es grande. Las concentraciones relativamente estáticas de esta hormona indican que un análisis simple durante el ciclo estral puede ser usado como un predictor válido de la población folicular y por lo tanto de la respuesta superovulatoria (Murphy, 2011).

2.11. AMH Y FERTILIDAD EN BOVINOS

Ribeiro *et al.* (2014); Jimenez-Krassel *et al.* (2015), en recientes informes observaron una asociación positiva entre la AMH y la fertilidad en vacas lecheras. Por ejemplo, en un estudio a gran escala realizado en Florida, Estados Unidos, informó que las vacas con bajos niveles plasmáticos de AMH tuvieron tasas de preñez más bajas al primer servicio y una mejor incidencia de pérdidas de preñez entre los días 30 y 65 de la gestación.

Por otra parte, vacas lecheras con niveles plasmáticos de AMH relativamente bajos cuando eran vaquillas también tuvieron tasas de supervivencia pos-parto más bajas en comparación con compañeras de rodeo de la misma edad que tenían mayores niveles circulantes de AMH (Jimenez-Krassel *et al.*, 2015).

Sin embargo, curiosamente parece que el tipo de inseminación artificial puede determinar el valor de utilizar o no AMH en un programa de cría. Por ejemplo, en

un ilustrado estudio hecho por Ribeiro *et al.* (2014), mostraron que no había relación alguna entre niveles plasmáticos de AMH y P/IA cuando se sincronizó la ovulación de las vacas para inseminación artificial a tiempo fijo (IATF).

Así pues, parece que el uso de protocolos para IATF pueden superar las posibles asociaciones de AMH con la fertilidad en el campo y esto puede llegar a explicar algunos de los resultados contrastantes que se han observado recientemente al trabajar con vacas Nelore. Por ejemplo, no se han encontrado correlación alguna entre una mayor población folicular antral (animales que probablemente tengan mayores niveles de AMH) y los resultados de concepción siguiendo los protocolos de IA en vacas sincronizadas Nelore adultas ($n = 758$) o vaquillas ($n = 1.113$); (Baruselli *et al.*, 2015).

Finalmente, debido a que parece haber una correlación madre-hija en el número de folículos antrales ováricos (Walsh *et al.*, 2014), lo que puede permitir la selección de animales con mayor AFP; recientemente se han analizado las posibles asociaciones entre niveles circulantes de AMH en pares madre-hija en las razas Holstein y Jersey (Batista *et al.*, 2015).

Aunque, Walsh *et al.* (2014), corrobora que, la AFP en el ganado es moderadamente heredable, Evans *et al.* (2012), reporta que factores epigenéticos tales como los niveles de balance energético negativo durante la vida fetal temprana, así como la edad de la madre y su estado de lactancia, probablemente puedan influir sobre el recuento de folículos antrales en las hijas.

De manera que estos factores epigenéticos podrían entonces explicar la baja correlación madre-hija en relación a los niveles plasmáticos AMH. En general, el valor de utilizar la medición de niveles plasmáticos de AMH para predecir la fertilidad en el campo sigue siendo controvertido, serán necesarios más estudios con un gran número de animales para sacar conclusiones definitivas (Baruselli *et al.*, 2015).

2.12. TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO PARA DETERMINACIÓN DE AMH (ELISA)

Abbas *et al.* (2012) en investigaciones reafirman que una de las técnicas más utilizadas para determinar concentraciones de hormonas es la técnica de Elisa. Existen diversas variaciones de la técnica de Elisa, pero la más utilizada es la denominada Elisa en sándwich, la cual utiliza dos anticuerpos reactivos con diferentes epitopes del antígeno cuya concentración se desea determinar.

La técnica de Elisa en sándwich se utiliza para identificar un antígeno específico de la muestra. La superficie de los pocillos se prepara con una cantidad límite de anticuerpos conocida, para capturar el antígeno. Después de la unión no específica se bloquean los sitios libres de la placa utilizando albúmina de suero bovino. Se agrega la muestra a la placa y a continuación se añade un anticuerpo primario específico para el antígeno. Después se agrega un anticuerpo secundario ligado a enzimas, que se unen al anticuerpo primario, conjugados anticuerpoenzima. Se añade el sustrato que es enzimáticamente convertido y genera un color que puede ser cuantificado (Gan y Patel, 2013).

2.13. RAZA DE GANADO BRAHMAN

2.13.1. ORIGEN DE LA RAZA DE GANADO BRAHMAN

La raza Brahman es considerada ideal para la producción de carne en países de excelentes condiciones tropicales y es utilizado como una opción válida para la producción de leche, en especial en sistemas de doble propósito al cruzarlo con ciertas razas especializadas. En cuanto a su expansión genética, ha sido totalmente exitosa, no solo ha beneficiado a los criadores ganado de puro, sino que además, los ganaderos han recibido el beneficio directo al implementar programas de cruzamiento con la raza, con lo cual se han logrado nuevos estándares de calidad y rentabilidad (González, 2017).

De acuerdo con González (2017), el árbol genealógico del actual ganado Brahman, se remonta al siglo XIX en los Estados Unidos. En varias investigaciones, autores relatan cómo se formó la raza en ese país a partir de 1860 y con múltiples cruces entre diversos ganados *Bos indicus*, importados directamente de la India. Se expone, que la mezcla efectuada durante décadas

incluyó el aporte de las razas Guzerát, Nelore, Krishna Valley, además del Gyr. Posteriormente se añadió un componente Red Polled y Red sindhi, razas que fueron introducidas en diferentes épocas a Norteamérica.

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

El desarrollo de esta tesis se realizó en la hacienda El Sombrero, ubicada en la parroquia Cascol, cantón Paján, Provincia de Manabí, Ecuador. La ciudad de Paján se encuentra a la altitud de 149 msnm, situada en el extremo sur de la Provincia de Manabí, República del Ecuador, entre las coordenadas sur: 1° 33' 0" y oeste: 80° 25' 60".

Cuadro 3.1. Condiciones climáticas del Cantón Paján

Variable climática	Valor
Precipitación media anual (mm)	1800
Temperatura media anual (°C)	24°C
Humedad relativa anual (%)	75,0 %
Evaporación media anual (mm)	1428,5

FUENTE: Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal del Cantón Paján

3.2. DURACIÓN DEL TRABAJO

La investigación tuvo una duración de 2 meses.

3.3. FACTORES EN ESTUDIO

Edad de las vaquillas y niveles séricos de la AMH.

3.4. TRATAMIENTOS

Se partió de una muestra de 20 vaquillas, las cuales fueron clasificadas en dos rangos de edad (entre 18 y 24 meses y de 25 a 30 meses de edad, respectivamente) y se procedió a determinar los niveles sanguíneos de la AMH de las vacas a fin de conformar tres rangos (de 100 a 200 pg/ml, de 200 a 300 pg/ml y de 300 a 400 pg/ml). Se utilizó un arreglo factorial de los tratamientos con dos niveles para los rangos de edad (Factor A) y tres rangos de AMH (Factor B), para un total de seis (6) tratamientos, tal como se señala a continuación:

Tratamiento	Rango de Edad	Rango AMH
T1	18 – 24 meses	100 – 200 pg/ml
T2	18 – 24 meses	200 – 300 pg/ml
T3	18 – 24 meses	300 – 400 pg/ml
T4	25 – 30 meses	100 – 200 pg/ml
T5	25 – 30 meses	200 – 300 pg/ml
T6	25 – 30 meses	300 – 400 pg/ml

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se empleó un diseño completamente al azar con los tratamientos organizados en el arreglo factorial (2 x 3).

Se detalla a continuación el modelo lineal aditivo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ij} = Observaciones del i – ésimo factor A y j – ésimo factor B

μ = Media general

α_i = Efecto del i – ésimo factor A (edad) i : 18 – 24 meses; 25 – 30 meses

β_j = Efecto del j – ésimo factor B (rangos HAM) j : 100 – 200; 200 – 300 y mas de 300 $\mu\text{g/ml}$

$\alpha\beta_{ij}$ = Efecto de la interacción entre el factor A y B

ϵ_{ijk} = Error experimental del i – ésimo factor A y j – ésimo factor B con media 0 y varianza comun

3.6. VARIABLES MEDIDAS

3.6.1. VARIABLES INDEPENDIENTES

- Edad de las vaquillas
- Niveles séricos de AMH.

3.6.2. VARIABLES DEPENDIENTES

- Cantidad de folículos ováricos (N^0)
- Tamaño de folículos ováricos (mm)
- Tamaño de cuerpos lúteos (mm)
- Tamaño de ovario (cm)

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis exploratorio de las variables bajo estudio (número de folículos ováricos, tamaño de folículos ováricos, tamaño de cuerpos lúteos y tamaño de ovarios) así como también el estudio de relaciones funcionales a través del análisis de correlación de Pearson y Análisis de regresión. Posteriormente, las variables en estudio fueron analizadas por medio de análisis de varianza (ADEVA), para conocer la significancia probabilística de los distintos factores en estudio también se incluyó las respectivas interacciones.

Previo al ADEVA, los valores de las características cuantificadas fueron examinados por las pruebas de normalidad de Wilk-Shapiro y la de homogeneidad de varianza de Bartlett por el programa ASSISTAT (2016), se encontró la necesidad de transformar los valores del número de folículos entre 4,1-7 y los mayores de 7 mm, en raíz cuadrada de $(X+1)$; así como también, los valores de las mediciones del cuerpo lúteo en $\log^{10}(X+10)$ para satisfacer supuestos para el análisis de varianza. Los análisis de varianza se realizaron con el software InfoStat (2016). El desdoblamiento de las interacciones significativas para las variables objeto de análisis se realizó de acuerdo con el valor crítico de la prueba de Tukey al 5% de error. Los resultados se presentan en cuadros y gráficos.

3.8. MANEJO DEL ENSAYO

Fueron seleccionadas 20 vaquillas Brahman de forma al azar, de las cuales 10 de ellas entre 18 y 24 meses y 10 entre 25 y 30 meses, los cuales eran animales puros de pedigrí. Todas fueron chequeadas por ultrasonografía (ecógrafo portátil digital Mindray, modelo DP-50VET, de 7.5 MHz, con transductor endorectal lineal de ultrasonido, fabricado en USA), con el objetivo de verificar patologías reproductivas, actividad ovárica y ciclicidad. De manera similar, se realizó un protocolo de sincronización de la ovulación, para igualar el día cero del ciclo estral de todos los animales.

Luego del procedimiento antes señalado, se tomaron las muestras de sangre (4ml) obtenidas por punción de la yugular, para ello se empleó tubos al vacío con heparina de sodio (BD Vacutainer® NH; Becton Dickinson and Co.).

Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su posterior envío al laboratorio. Luego fueron procesadas en el laboratorio de UNIMEVET, en donde se las sometió a centrifugación refrigerada (3200 revoluciones/minutos a 4°C) y almacenadas inmediatamente a -20° C hasta su posterior análisis por ELISA para determinar los niveles séricos de AMH.

Se efectuó una prueba de ELISA para determinación de AMH en suero sanguíneo de las vaquillas experimentales se efectuó con el uso de kits de MOFA® para muestras de bovino (AMH ELISA simple test Kit Bovine Serum, 40 samples Max/Kit 21700/100) y el lector "Infinite 200 PRO Multimode Multiplate Reader". Las concentraciones de AMH fueron medidas en muestras de 50 µL de suero.

Las muestras de suero fueron descongeladas en baño de maría justo antes de la prueba de ELISA, sometidas a sacudido en vortex (MRC, Modelo: SI-100) y centrifugadas (C2203, Liston) a 3,200 revoluciones/minuto a 4°C. Seguidamente, las muestras se incubaron por 12 horas a 4°C en presencia de un primer anticuerpo, luego por 1,5 horas a temperatura ambiente en presencia del segundo anticuerpo para inmediatamente hacer las lecturas.

Concomitantemente, se realizó la ultrasonografía endorrectal del seguimiento de la dinámica folicular a través del conteo y medición del tamaño de los folículos ováricos, tamaño de ovario, hasta llegar a la ovulación; similarmente se midió el cuerpo lúteo.

3.9. MÉTODOS EXPERIMENTALES

3.9.1. NÚMERO Y TAMAÑO DE FOLÍCULOS OVÁRICOS.

Mediante conteo y medición (mm) se determinó el número y tamaño de los folículos con el uso de ultrasonografía endorrectal, a intervalos de 24 horas de acuerdo con el seguimiento de la onda folicular, durante todo el ciclo estral. Posteriormente fueron agrupados dentro de los rangos: 2 – 4 mm; 4,1 – 7 mm y mayores de 7 mm.

3.9.2. TAMAÑO DE CUERPOS LÚTEOS

Por ultrasonografía endorrectal se determinó la presencia de cuerpo lúteo 48 horas después de los signos de celo.

3.9.3. TAMAÑO DE OVARIOS

El tamaño del ovario (cm) se midió mediante ultrasonografía endorrectal al inicio del experimento.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS EXPLORATORIO DE LOS DATOS

El Cuadro 4.1 muestra los valores de las medidas de tendencia central (media y mediana) y las de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación) y el intervalo de confianza de las variables evaluadas durante la investigación.

La variable número de folículos totales en sus medidas de tendencia central (media y mediana) presentó valores de 37,15 y 35,00 respectivamente; para las medidas de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación) valores de 13,59 y 36,60%, respectivamente, con intervalo de confianza de $\leq 30,79 \mu \leq 43,41$. Para el número de folículos entre 2-4 mm, el valor promedio fue del orden de 35,45 y mediana de 35,00; la desviación estándar de 14,01 y el coeficiente de variación de 39,50%, con intervalo de confianza $28,89 \leq \mu \leq 42,01$.

En cuanto al número de folículos con diámetros comprendidos entre 4,1-7 mm sus valores promedios fueron del orden de 0,45 mm, con mediana de 0,00 mm; desviación estándar de 0,83 y coeficiente de variación de 183,5; el intervalo de confianza de confianza fue de $0,06 \leq \mu \leq 0,84$.

Para los folículos mayores de 7 mm se encontraron valores promedios de 0,90 mm, mediana de 1,00 mm; desviación estándar de 0,85 y coeficiente de variación 94,7 %; el intervalo de confianza correspondió a $0,50 \leq \mu \leq 1,30$. La variable tamaño del cuerpo lúteo, presentó valor promedio del orden de 2,08 mm, mediana de 1,18; siendo la desviación estándar de 3,94 y el coeficiente de variación de 189,7%, con intervalo de confianza de $0,23 \leq \mu \leq 3,92$ y finalmente la variable tamaño de los ovarios, que presentó promedio de 2,73 y mediana de 2,62; desviación estándar de 0,47 y coeficiente de variación de 17,0%, su intervalo de confianza fue $\leq 2,52 \mu \leq 2,95$.

Por los valores observados de los coeficientes de variación en las variables estudiadas se puede constatar que la mayor dispersión la presentaron las variables número de folículos entre 4-7 y los mayores de 7 mm, así como también el tamaño del cuerpo lúteo. Probablemente dentro de los folículos formados por

las vaquillas sean estos los más dispersos en tamaño y cantidad en consecuencia su alta variabilidad.

Caso similar se observó para el tamaño del cuerpo lúteo donde la variabilidad en magnitud expresada por el coeficiente de variación fue prácticamente similar a la observada para los folículos comprendidos entre 4,1-7 mm; este comportamiento, se ratifica en sus respectivos intervalos de confianza donde las amplitudes son mayores en relación al valor promedio y discrepan en relación a la variabilidad del tamaño de los ovarios que presentaron un intervalo de confianza muy estrecho, tal particularidad demuestra la confiabilidad de la variable desde el punto de vista biológico.

Esta gama de diferenciación observada en las distintas variables cuantificadas parece obedecer a una dinámica folicular que podría estar vinculada a la maduración de un folículo único y posterior conformación del cuerpo lúteo en momentos distintos del ciclo estral.

Cuadro 4.1. Resumen descriptivo de las variables número total de folículos, folículos de 2-4 mm, folículos de 4,1-7 mm, folículos >7 mm, tamaño de ovarios (cm) y tamaño del cuerpo lúteo (mm) en vaquillas Brahman con diferentes rangos de la AMH.

Estadístico	Folículos				Tamaño Cuerpo lúteo	Tamaño ovarios	
	Total	2-4	4,1-7	>7			
Media	37,15	35,45	0,45	0,90	2,08	2,73	
Mediana	35,00	33,50	0,00	1,00	1,18	2,62	
Desviación estándar	13,59	14,01	0,83	0,85	3,94	0,47	
Coef. de variación	36,60	39,50	183,5	94,7	189,7	17,0	
Intervalo de confianza (95%)	Min	30,79	28,89	0,06	0,50	0,23	2,52
	Max	43,51	42,01	0,84	1,30	3,92	2,95

Coef.= Coeficiente

Erickson (1996), demostró que existe una variabilidad inherente en el número de folículos presentes en los ovarios de las vaquillas, destacando que el grupo de folículos primordiales dentro de los ovarios recolectados de vaquillas menores de 1 año osciló entre 60000 y 240000, mientras que, en ovarios recolectados de vacas fértiles versus infértiles de 5 años reportó una diferencia de 6 veces

(119000 versus 18000, respectivamente). Por otra parte, Ireland *et al.* (2007) encontraron una diferencia de siete veces en el número de folículos antrales de los bovinos adultos jóvenes, pero observó una consistencia dentro de los individuos para el número de folículos antrales dentro de las ondas foliculares.

Similarmente, Hernández (2012), señala que la hembra bovina nace con aproximadamente 200 mil folículos, de los cuales muy pocos se activan o inician su crecimiento y la mayor parte de ellos sufre atresia en diferentes etapas de desarrollo. La dinámica folicular genera dos o tres ondas durante el ciclo estral y comienza con el reclutamiento de folículos antrales pequeños con tamaños de 2 a 4 mm (Borges *et al.*, 2001).

Aerts y Bols (2010), corroboran que el reclutamiento comienza con un grupo de 5 a 10 folículos que pasan por un proceso de selección que resulta en un único folículo dominante y se produce la regresión de los folículos restantes. La evolución del folículo ovulatorio desencadena la ovulación cuando se produce la ruptura del folículo y el ovocito es liberado. En el ovario, el espacio vacío del folículo ovulado es llenado rápidamente de sangre, y posteriormente se origina una estructura transitoria denominada cuerpo hemorrágico, como preámbulo a la formación y consolidación del cuerpo lúteo (Hunter *et al.*, 2004).

Esta descripción desde la perspectiva fisiológica justifica los bajos porcentajes de folículos de diámetros mayores (de 4 a 7 mm y mayores de 7 mm) y el bajo número de cuerpos lúteos, y a la vez, podría incidir en la gran variabilidad encontrada en esta investigación, ya que se parte de un número elevado de folículos y sólo uno de ellos alcanza la maduración y, por tanto, se formará un solo cuerpo lúteo.

4.2. RELACIONES ENTRE VARIABLES

4.2.1. ANALISIS DE CORRELACIÓN

Se observa en el Cuadro 4.2 correspondiente al análisis de correlación de Pearson entre las variables estudiadas, la presencia de relaciones positivas y significativas por la prueba de t a 1% de probabilidad entre los niveles de la AMH con el número total de folículos y con el número de folículos entre 2-4 mm. Otra

correlación altamente significativa y positiva fue observada entre el número total de folículos y los folículos entre 2-4 mm.

Cuadro 4.2. Coeficientes de correlación de Pearson para las variables número total de folículos, folículos de 2-4 mm, folículos de 4,1-7 mm, folículos >7 mm y tamaño de los ovarios (cm) y del cuerpo lúteo (mm) en vaquillas Brahman con diferentes niveles de la AMH.

Variable	AMH (pg/ml)	Folículos (mm)				Tamaño C. Lúteo	Tamaño ovarios	
		Total	2-4	4,1-7	>7		Derecho	Izquierdo
AMH (pg/ml)	1	0,001	0,001	0,12	0,42	0,99	0,25	0,38
Número folículos total	0,697**	1	0,001	0,36	0,28	0,99	0,64	0,98
Folículos 2-4 mm	0,698**	0,993**	1	0,34	0,29	0,72	0,72	0,96
Folículos 4-7 mm	-0,370	-0,223	-0,231	1	0,06	0,42	0,08	0,55
Folículos >7 mm	-0,195	-0,262	-0,254	-0,442	1	0,88	0,26	0,84
Tamaño cuerpo lúteo	-0,005	-0,004	-0,088	-0,195	0,036	1	0,89	0,65
Tamaño ovario derecho	0,279	-0,113	-0,088	-0,413	0,275	0,034	1	0,002
Tamaño ovario izquierdo	0,213	0,005	0,012	-0,145	0,051	0,110	0,674**	1

**Diferencia altamente significativa ($p=0,01$)

Esta respuesta de relación estructural entre las variables correlacionadas explica la influencia que la AMH posee sobre la producción de folículos, entre ellos, el número total y los de 2-4 mm que predominan entre los cuantificados en vaquillas Brahman, independientemente de la edad y del nivel de la hormona.

Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Benyei *et al.* (2003), quienes encontraron que las concentraciones de la AMH están correlacionadas con el recuento de folículos antrales del ovario, el número de folículos y el número de ovocitos sanos. Similarmente, Center *et al.* (2018) también encontraron correlaciones positivas entre la AMH en circulación y el número de folículos, y con el número de cuerpos lúteos. Por su parte, Ireland *et al.* (2008) determinaron una correlación altamente positiva con las concentraciones de AMH, el tamaño del ovario y el número total de ovocitos morfológicamente sanos en los ovarios.

Burns *et al.* (2005), informaron que el número máximo de folículos antrales determinado al inicio de la onda folicular, dentro del mismo ciclo estral o durante ciclos estrales consecutivos, tuvo una alta repetibilidad en una población mixta de vaquillas lecheras nulíparas. En función de estos resultados, Ireland *et al.*, (2011), afirman la recolección de una sola muestra de sangre durante el ciclo estral y la medición de la concentración sérica de la AMH como un biomarcador fiable que refleja el número de folículos antrales, el tamaño de ovario y la cantidad total de folículos y ovocitos en ovarios de ganado adulto joven.

Peña y Correa (2018), resaltan la utilidad de estos resultados en tratamientos de reproducción asistida, ya que mientras más elevados sean los niveles séricos de AMH, mayor será la respuesta folicular obtenida en vacas donantes. En este sentido, Hirayama *et al.* (2012), encontraron que la concentración plasmática de AMH se correlacionó de manera significativa con el número de folículos, el número de óvulos, el número de embriones fertilizados y el número embriones transferibles.

Particularmente, llama la atención en la matriz de correlaciones la presencia de relaciones negativas entre los niveles de la AMH y las variables números de folículos entre 4,1-7 mm y los folículos mayores de 7 mm, inclusive el cuerpo lúteo, aunque no presentaron efectos significativos. Esta situación podría estar asociada a lo señalado por Lussier *et al.* (1987), quienes determinaron que el crecimiento inicial de los folículos es lento, pero una vez que se diferencia el folículo dominante y ocurre la atresia de los restantes, el desarrollo posterior es rápido, con tasas de crecimiento de hasta 2 mm/día en folículos antrales, y se pierde el efecto de la AMH como sustancia controladora de la actividad folicular.

Contrariamente, Rico *et al.* (2012) reportaron correlaciones positivas entre AMH y folículos grandes y el número de cuerpos lúteos en vacas superovuladas, lo cual fue corroborado por Souza *et al.* (2015) al encontrar correlaciones positivas similares entre la AMH y el número de cuerpos lúteos y los óvulos o embriones recuperados después de la superovulación. Por su parte, Center *et al.* (2018) señalan que la AMH circulante tiene correlaciones positivas significativas con el número de folículos, la tasa de ovulación y el número de embriones recuperados.

Otra correlación positiva y altamente significativa se observó entre el tamaño del ovario derecho y el izquierdo, posiblemente esta relación matemática involucre aspectos de la naturaleza anatómo-fisiológica de las vaquillas Brahman. Las otras correlaciones estudiadas no muestran efectos significativos, positivos y/o negativos que pudieran establecer una posible relación entre las variables evaluadas en esta investigación.

4.2.2. ANALISIS DE REGRESIÓN

El análisis de regresión entre los niveles de la AMH y el número total de folículos (Gráfico 4.1) mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$); con un coeficiente de determinación de 0,75; significativo a 5% de probabilidad, por la prueba de t, lo cual indica una relación causa-efecto entre la variable independiente (niveles de la AMH) y la variable dependiente (número total de folículos).

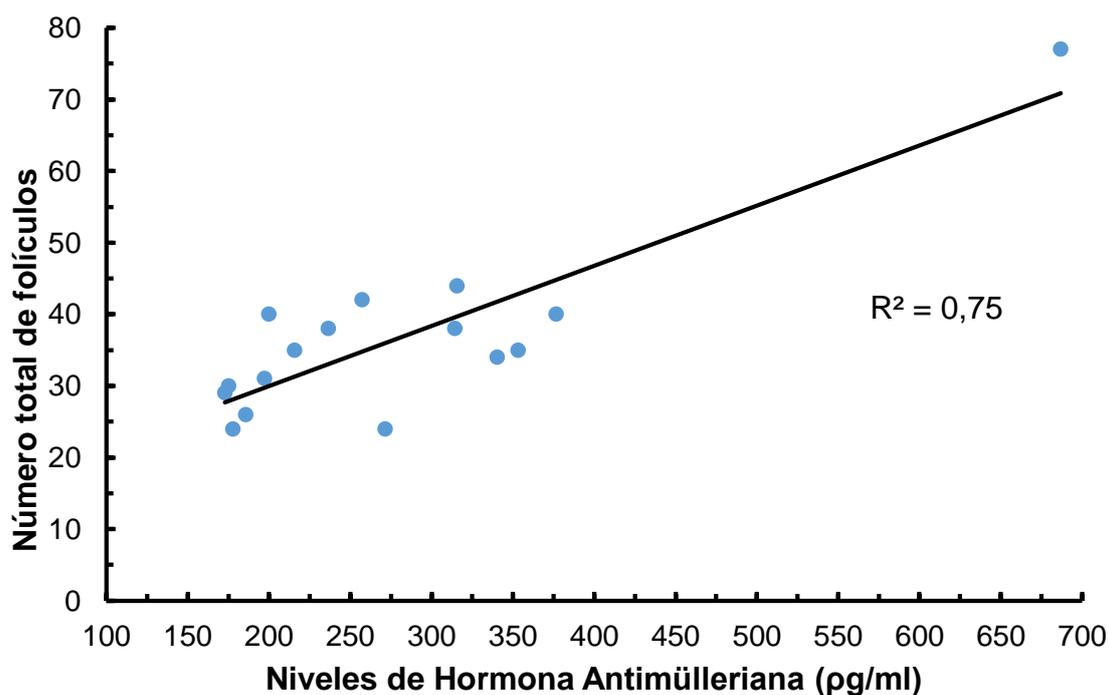


Gráfico 4.1. Comportamiento del número total de folículos en función de los niveles de la AMH en vaquillas Brahman.

Este comportamiento indica que ocurrió un incremento lineal de la producción de folículos en la medida que aumentaron los niveles de la AMH, siendo el valor máximo del número de folículos se detecta cuando los tenores de la hormona alcanzan los 700 pg/ml. Este nivel corresponde al más elevado de la hormona cuantificado en esta investigación. Ribeiro *et al.* (2014), informaron que las concentraciones plasmáticas de AMH en el ganado lechero lactante variaron de 10 a 3198 pg/ml, pero sólo reportaron que menos de 3% de las vacas tenían concentraciones superiores a 700 pg/ml.

De manera similar, cuando se realizó el análisis de regresión para establecer relaciones entre los niveles de la AMH y el número de folículos de 2-4 mm (Gráfico 4.2), se encontró un ajuste lineal, con un coeficiente de determinación de 0,76; significativo al 5% de probabilidad, lo que consolida una relación causa-efecto entre los niveles de la AMH y el numero de folículos comprendidos entre 2-4 mm.

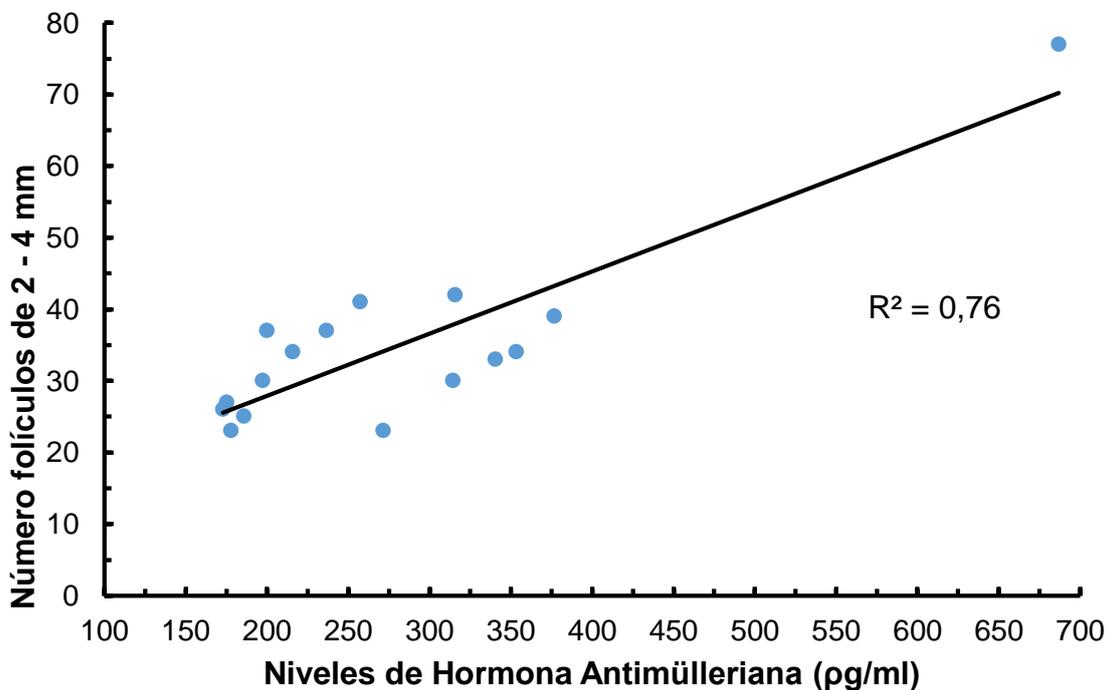


Gráfico 4.2. Comportamiento del número de folículos de 2 – 4 mm en función de los niveles de la AMH en vaquillas Brahman.

De acuerdo a los valores de correlación observados en el Gráfico 4.2, los cuales fueron altamente significativos y positivos entre los niveles de la AMH y las variables número de folículos totales y número de folículos entre 2-4 mm, era de

esperarse que el ajuste de ambas regresiones fuese similar dada la alta correlación que existe entre dichas variables, este resultado se ratificó en las ecuaciones con ajustes lineales de ambas variables respuesta.

Para ambas ecuaciones de regresión, las variables respuesta número total de folículos y número de folículos entre 2-4 mm se observó que la mayor actividad de ambas variables se detectó en el mayor rango de la AMH que correspondió a 700 pg/ml.

Estos resultados concuerdan con los de Ireland *et al.* (2008), quienes aseguran 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. De forma similar, reportaron que la variación en el número de folículos antrales durante las olas foliculares está asociada a las alteraciones en las concentraciones circulantes de AMH. Hallazgos similares han sido reportados por Melado (2014) y Jimenez *et al.*, (2015).

Por otro lado, Del Río *et al.* (2017) determinaron que la AMH es un marcador fisiológico predictivo de la fertilidad postparto en vacas de raza Holstein sometidas a un protocolo de sincronización de la ovulación, puesto que vacas con niveles altos de AMH (>300 pg/ml) tuvieron una mayor tasa de preñez después de la inseminación artificial, requirieron menos servicios por concepción y tuvieron menos días abiertos en comparación con vacas con niveles normales (<300 pg/ml).

Varios estudios han demostrado que las concentraciones de AMH son variables entre los grupos genéticos y están fuertemente asociadas el número de folículos antrales. Guerreiro *et al.* (2014) reportaron que en el ciclo estral de vaquillas Nelore (24-26 meses de edad) las concentraciones promedio de AMH en suero alcanzaron un valor de 1,4 ng/ml. Pfeiffer *et al.* (2014), obtuvieron concentraciones de AMH entre 0,042 y 0,054 ng/ml en Angus, Charolais y vaquillas cruzadas nulíparas, respectivamente. Las concentraciones de AMH y el número de folículos fueron mayores en Gyr (0,6 ng/ml y 60,0 respectivamente)

en comparación con Holsteins (0,24 ng/ml y 35,9, respectivamente) y búfalos (0,18 y 25,6 respectivamente) de la raza Murrah (Baldrighi *et al.*, 2014).

El análisis de regresión entre las edades de las vaquillas y el número total de folículos presentó un ajuste del tipo cuadrático positivo (Gráfico 4.3), con un coeficiente de determinación de 0,73; significativo al 5% de probabilidad. Tal resultado indica una relación causa-efecto entre la edad de las vaquillas y la variable respuesta número total de folículos, o en otras palabras están perfectamente vinculadas desde el punto de vista biológico de acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación.

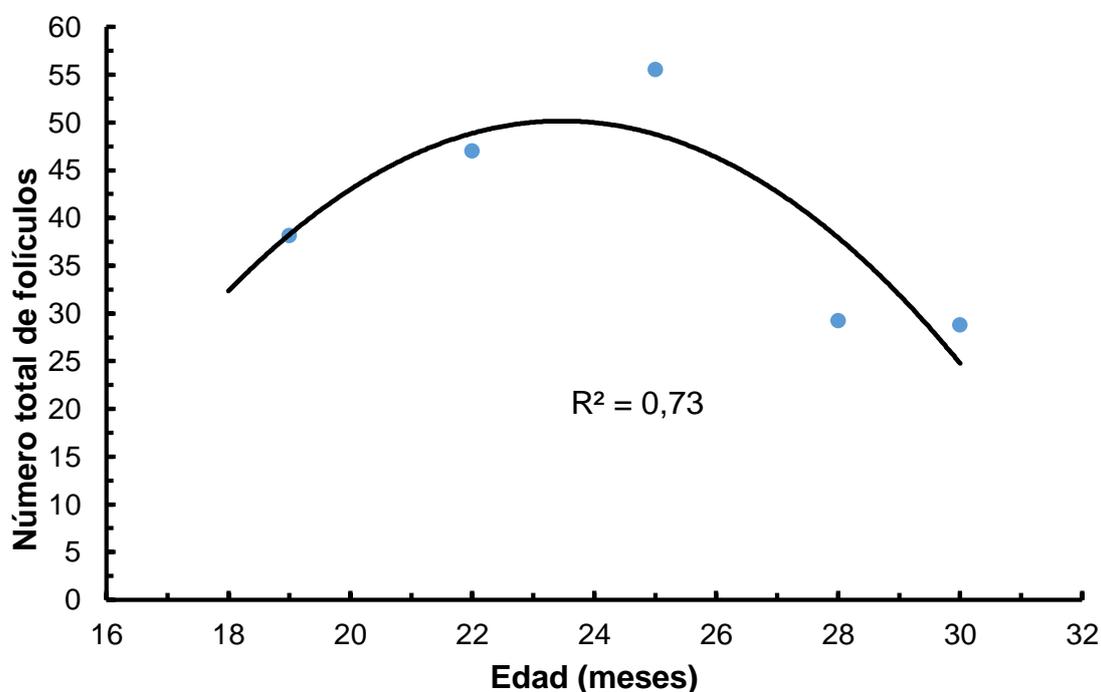


Gráfico 4.3. Comportamiento del número de folículos totales en función de la edad en vaquillas Brahman.

El recuento de folículos antrales refleja la reserva de folículos ováricos y se ha relacionado con la fertilidad en las vacas (Mossa *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2015). Cushman *et al.* (2009) señalan que la edad tiene un impacto negativo en el número de folículos antrales. En este sentido, Morotti *et al.* (2017), encontraron que en las vaquillas, el número de folículos antrales en el destete y la edad de un año es muy variable entre los individuos, pero solo experimenta una ligera variación mostrando una alta repetibilidad dentro de la misma hembra. La estabilidad de la concentración de AMH permite su determinación mediante una única medición en etapas aleatorias del ciclo estral.

La evaluación de la concentración de AMH en circulación durante una etapa temprana, como en becerros y vaquillas recién nacidos, es conveniente para la selección de vaquillas para la reproducción y la producción de embriones. Sin embargo, se ha demostrado que la concentración de AMH circulante en el ganado de carne varía mucho con el crecimiento (Monniaux *et al.*, 2012; Mossa *et al.*, 2013).

El punto de máxima actividad para el número de folículos de acuerdo a la segunda derivada corresponde a los 23,5 meses de edad de las vaquillas y a partir de allí comienza un descenso pronunciado del número total de folículos que alcanzan los más bajos niveles en vaquillas de edades comprendidas entre los 28 y 30 meses, respectivamente.

Koizumi y Kadokawa (2017), observaron una correlación positiva entre la concentración plasmática de AMH y la edad (en meses), destacando que las vacas multíparas tenían concentraciones de AMH más altas que las vacas primíparas. Por otro lado, Hirayama *et al.* (2012), en investigaciones con vacas negras japonesas, no encontraron ningún efecto de la edad sobre las concentraciones plasmáticas de AMH, a diferencia de los reportes en vacas Holstein (Rico *et al.*, 2012, Souza *et al.*, 2015); sin embargo, indican que la edad y el número de partos influyen significativamente en las concentraciones plasmáticas de AMH en vacas negras japonesas, y por asociación, afecta directamente el número de folículos.

Debido a que el número de folículos refleja la reserva de los folículos ováricos, se espera que los animales más viejos tengan reservas foliculares más pequeñas y, en consecuencia, menor número de folículos. Esta relación fue observada por Burns *et al.* (2005) en vacas Holstein y Cushman *et al.* (2009) en hembras mestizas. En las hembras de Tabapuã, la reducción de la reserva folicular ocurre en un periodo más tardío, ya que las vaquillas nulíparas tenían recuentos de folículos menores, que aumentaron de manera constante hasta los 14 años, momento a partir del cual comenzó a disminuir (Maculan *et al.* 2018).

4.3. ANÁLISIS DE LA VARIANZA

De acuerdo al análisis de varianza expresados en el Cuadro 4.3, se puede observar que para las variables número total de folículos, número de folículos comprendidos entre 2-4 mm, solo se detectó diferencias significativas a nivel de la interacción edad de las vaquillas por rangos de AMH; mientras que, para el caso de las variables número de folículos de diámetro entre 4,1-7 mm (transformada en raíz $(X+1)$) y número de folículos de diámetros mayores de 7 mm, no se detectaron diferencias significativas tanto en los factores individuales como en su interacción, similar comportamiento presentó la variable cuerpo lúteo, transformada para efectos de análisis en $\text{Log}_{10}(X+10)$.

Cuadro 4.3. Resumen del análisis de varianza para las variables número de folículos, folículos de 2-4 mm, folículos de 4,1-7 mm, folículos >7 mm, tamaño de ovarios (cm) y tamaño del cuerpo lúteo (mm), en vaquillas Brahman con diferentes rangos de la AMH.

Fuente de variación	GI	Cuadrados Medios					
		Foliculos (mm)				Tamaño ovarios	Cuerpo lúteo ††
		Totales	2-4	4,1-7†	> 7†		
Rango Edad	1	47,09 ^{ns}	30,0 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,12 ^{ns}	1,03*	0,0014 ^{ns}
Rangos AMH	2	439,8 ^{ns}	449,1 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,36 ^{ns}	0,0114 ^{ns}
Edad x Rangos AMH	2	519,3*	603,1*	0,23 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,0073 ^{ns}
Error	14	118,5	125,1	0,05	0,08	0,16	0,0140
Coefficiente de variación (%)		29,3	31,6	19,7	21,3	14,7	10,9

† Datos transformados en raíz $(X+1)$

†† Datos transformados $\text{Log}_{10}(X+10)$

Para la variable tamaño de los ovarios (cm) se detectó diferencia únicamente para el factor individual rango de edad de las vaquillas.

En el Cuadro 4.4 se puede observar el desdoblamiento de la interacción edad de las vaquillas*rangos de la AMH (Edad*Rangos AMH) donde se constató efectos significativos en la interacción para las dos variables, se observa que las diferencias observadas favorecen a las vaquillas de edades entre 25 y 30 meses.

Cuadro 4.4. Resumen del análisis de varianza para el desdoblamiento de las interacciones significativas entre los rangos de edad y los rangos de la hormona para las variables número total de folículos, folículos de 2-4 mm en vaquillas Brahman con diferentes niveles de la AMH.

Fuente de variación	Gl	Cuadrados Medios	
		Foliculos (mm)	
		Totales	2-4
Rangos AMH/18-24 meses	1	111,8	130,2
Rangos AMH/25-30 meses	1	454,5*	502,9*
Error	14	118,5	125,14

*Diferencia Significativa

4.3.1. NÚMERO TOTAL DE FOLÍCULOS

En Gráfico 4.4 se presenta de forma gráfica la partición de la interacción para la variable número total de folículos, en la que se destaca que no hubo diferencias significativas ($P \geq 0,05$) entre las vaquillas de edades comprendidas entre 18 y 24 meses en los diferentes rangos de la AMH; mientras que para las vaquillas de edades comprendidas entre 25 y 30 meses de edad, el rango de más de 300 pg/ml de AMH resultó con diferencias significativas a los rangos de 100 – 200 y 200 – 300 pg/ml, estos dos últimos resultaron similares entre sí.

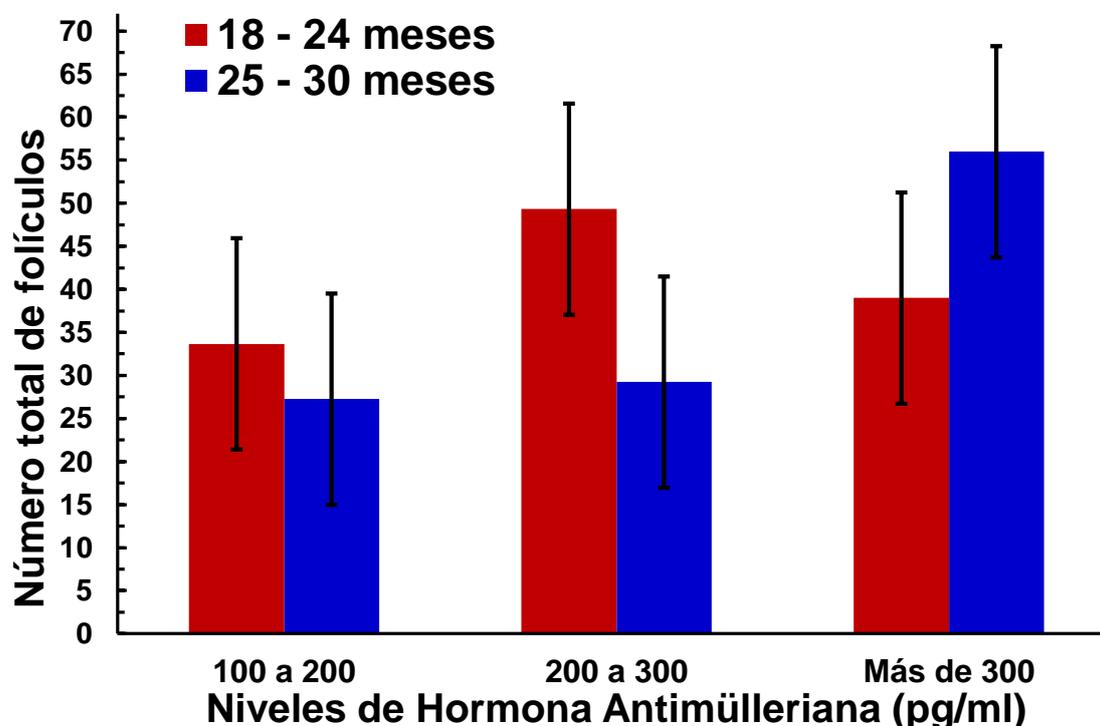


Gráfico 4.4. Desdoblamiento de la interacción rangos de edad de las vaquillas * rangos de la AMH en relación a la variable número total de folículos (barras de error corresponden al nivel crítico de Tukey al 5%).

Estudios seriados han reportado que los niveles elevados de la AMH se verán reflejados en una óptima repuesta folicular, es decir en un elevado número de

folículos; en este contexto, Batista *et al.* (2014); Batista *et al.* (2015), reportan que los niveles AMH se correlacionan con la población folicular antral (AFP) en el ganado bovino de diferentes edades, categorías y grupos genéticos. Por otro lado, en un estudio realizado por Ireland *et al.* (2007), se determina que las concentraciones de AMH fueron aproximadamente seis y dos veces mayores en animales con un recuento de folículos antrales altos o intermedios, respectivamente, en comparación con los de baja concentración.

Gobikrushanth *et al.* (2018), en un estudio realizado en vacas Holstein, reportan las concentraciones de AMH se ven aumentadas cuando existe un mayor reclutamiento y desarrollo folicular ovárico hasta los cinco años de edad. Lo que permite inferir que en relación a los niveles óptimos de AMH, el mayor número de folículos está asociado al mayor rango de AMH y a las vaquillas de edades comprendidas entre 25-30 meses de edad.

4.3.2. NÚMERO DE FOLÍCULOS DE DIÁMETRO DE 2 A 4 MM

En el Gráfico 4.5 se presenta de forma gráfica los resultados de la interacción entre edad de los animales y los niveles de AMH sérica, en la que se observa diferencia ($P \geq 0,05$) del número de folículos con diámetros de entre 2-4 mm de las vaquillas de las edades de 25-30 meses, con rangos de AMH de más de 300 pg/ml con respecto a las otras interacciones.

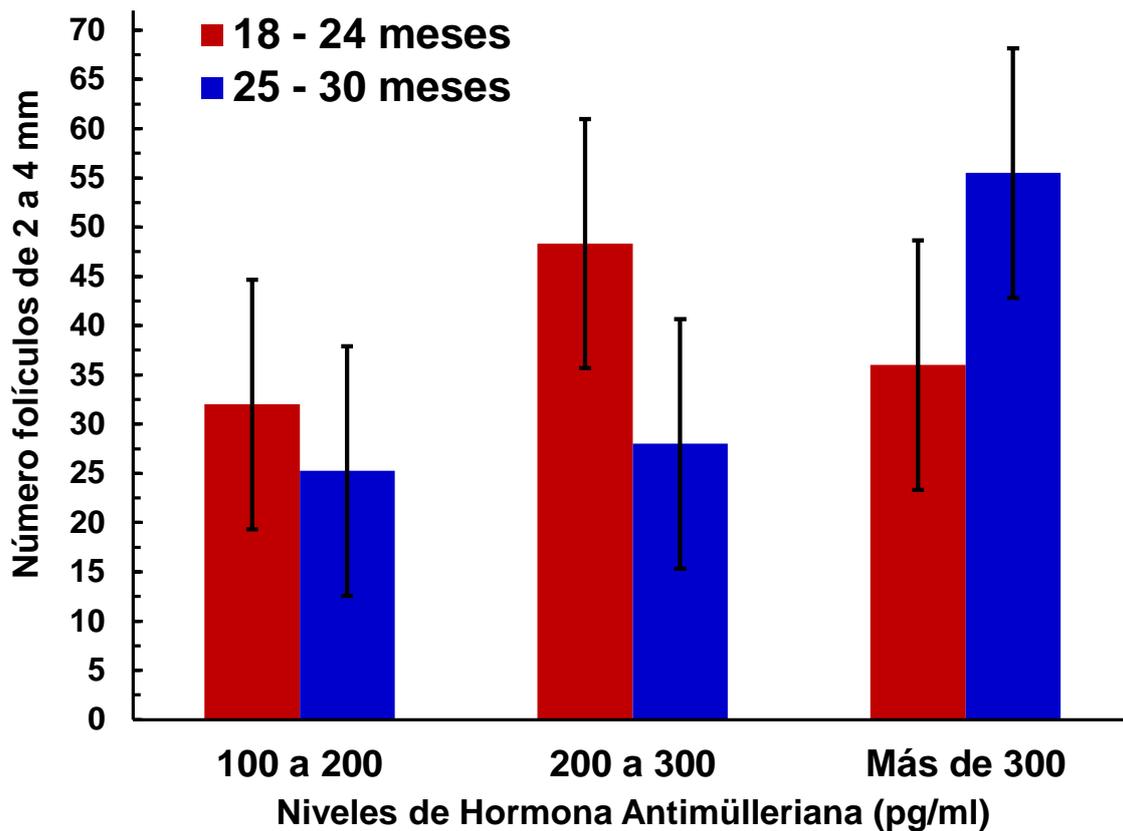


Gráfico 4.5. Desdoblamiento de la interacción rangos de edad de las vaquillas * rangos de la AMH en relación a la variable número de folículos de 2 a 4 mm (barras de error corresponden al nivel crítico de Tukey al 5%).

Este comportamiento es similar al verificado para la variable número de folículos totales, con el cual guarda una alta correlación, la tendencia es a obtener la mayor cantidad de folículos en el rango más elevados de la hormona, esto indica la prevalencia de los folículos de menor diámetro durante el conteo folicular.

Bajo este contexto, García Guerra *et al.* (2017) coinciden que la producción de AMH se limita a las células granulosas de los folículos en crecimiento, siendo que el mayor aporte lo realizan los folículos preantrales grandes y folículos antrales pequeños.

Estos resultados son similares a los reportados por Gobikrushanth *et al.* (2018) en la evaluación de vacas Holstein, quienes reportaron que las concentraciones circulantes de AMH aumentan con un mayor reclutamiento folicular ovárico hasta los 5 años de edad y luego disminuyen como consecuencia del agotamiento gradual de la reserva ovárica. Por su parte, Ribeiro *et al.* (2014), reportan que vacas de 2 y 3 partos mostraron concentraciones de AMH más altas que las de un solo parto, y que las vacas con baja concentración de AMH tenían menores

tasas de preñez después del primer servicio, mayor incidencia de pérdida de la gestación y menor tasa de gestación en el siguiente parto.

En relación a los niveles óptimos de la AMH, los mejores resultados obtenidos en este estudio que se lograron con los rangos superiores a 300 pg/ml en vacas menores de cinco años, lo cual concuerda con lo reportado por Del Río *et al.* (2017), quienes afirman que la fertilidad postparto en vacas de raza Holstein sometidas a protocolo de sincronización de la ovulación con niveles de AMH superiores a 300 pg/ml tuvieron mayor tasa de preñez después de la inseminación artificial y requirieron menos servicios por concepción en comparación con vacas con niveles hormonales inferiores a 300 pg/ml.

4.3.3. NÚMERO DE FOLÍCULOS DE DIÁMETROS COMPRENDIDOS ENTRE 4,1-7 MM

En la descomposición de la interacción (Figura 4.6) provenientes de los análisis de varianza, se observa que las medias no presentaron diferencias, aunque el mayor número de folículos con diámetro de entre 4,1 a 7 mm correspondieron a la interacción vaquillas entre 25 y 30 meses con los niveles séricos de AMH de 100-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

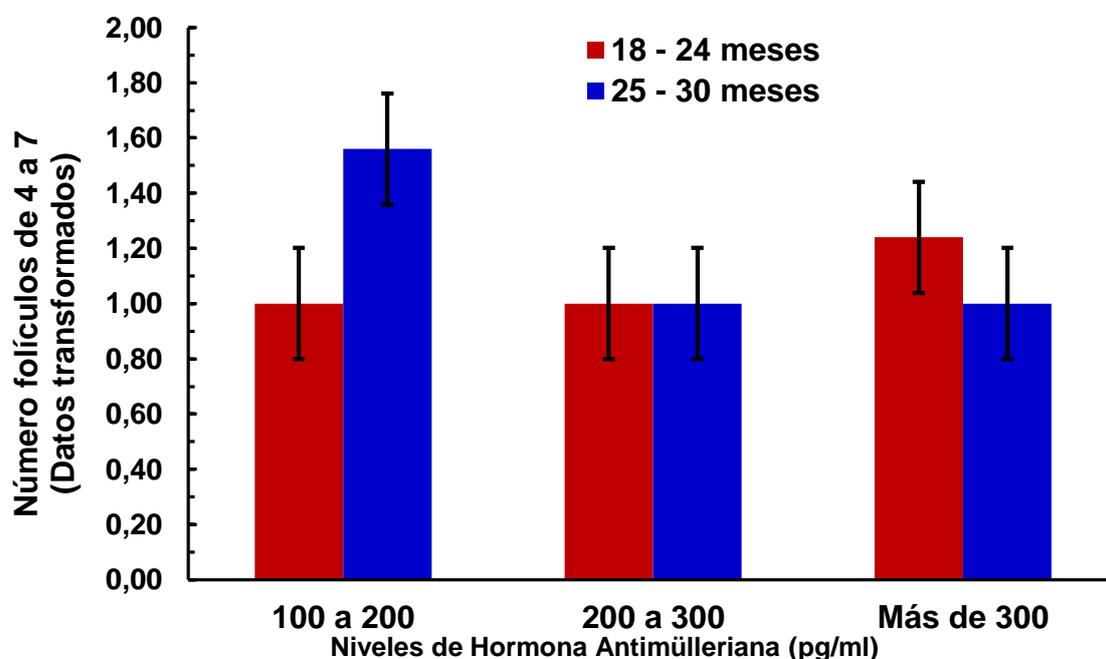


Gráfico 4.6. Desdoblamiento de la interacción los rangos de edad de las vaquillas*rangos de la AMH en relación con la variable número de folículos de 4,1 a 7 mm (barras de error corresponden al nivel crítico de Tukey al 5%).

Para esta variable, se constata la situación contraria a la observada en las variables número total de folículos y número de folículos entre 2-4 mm, en las cuales se obtuvieron los mayores valores dentro de los mayores rangos de AMH; aunque, se ratifica que es en las vaquillas de 25 y 30 meses donde ocurre la mayor actividad. Tal respuesta estaría vinculada a lo señalado por Rojas *et al.* (2014), en relación con la reducción del número final de folículos preovulatorios durante el proceso de maduración folicular que conduce a la monoovulación en el ganado bovino.

Rico *et al.* (2009), encontraron que las concentraciones de AMH fueron mayores en vacas con folículos antrales de 3-7 mm de diámetro, en comparación con aquellas con folículos grandes (> 7 mm de diámetro), e infieren que los mayores niveles de AMH están asociados a la mayor proporción de folículos antrales pequeños y medianos que estaban activos en el momento de iniciarse la onda folicular.

En contraste Koizumi y Kadokawa (2017) no detectaron ninguna relación entre la concentración plasmática de AMH y el número de folículos mayores de 5 mm, los tamaños de los folículos más grandes en los ovarios, el tamaño del cuerpo lúteo o la concentración plasmática de progesterona, lo cual se atribuyó a que casi toda la AMH plasmática se originó a partir de células de la granulosa de los folículos antrales pequeños y preantrales y no de los folículos antrales más grandes o el cuerpo lúteo (Bhide *et al.*, 2016).

4.3.4. TAMAÑO DE OVARIOS

Para la variable tamaño de los ovarios sólo se detectaron diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$) para el efecto simple del rango de edad de las vaquillas. En el Cuadro 4.5, se destaca que el mayor tamaño de los ovarios le correspondió a las vaquillas entre los 25 y 30 meses de edad, que fueron significativamente superiores a los ovarios de las vaquillas de edades comprendidas entre los 18 y 24 meses.

Cuadro 4.5. Comparación entre el tamaño de los ovarios (cm) en vaquillas de edades comprendidas entre los 18-24 y 25-30 meses, por la prueba de Tukey a 5% de probabilidad.

Rango de edad	Tamaño de ovarios (cm)	Ámbito estadístico
18-24	2,53±0,43	B
25-30	3,00±0,44	A

Estos resultados podrían deberse a la falta de madurez sexual en las vaquillas de 18-24 meses, que se manifiesta en el escaso desarrollo de sus estructuras reproductivas. Bastidas (1999), ha reportado que la edad al primer cuerpo lúteo en vaquillas Brahman oscila en un rango de 14 a 27 meses, que representa un periodo bastante amplio en el proceso de maduración sexual. Por otra parte, Mora (2005), plantea que el primer parto de vaquillas Brahman suceda cuando la hembra se encuentre entre 35-40 meses, ya que a esta edad el animal ha completado su desarrollo físico y fisiológico.

Una consideración importante es que el tamaño de cualquier estructura anatómica puede estar relacionado con el tamaño del animal, y las medidas generales del cuerpo, por lo tanto, deben tenerse en cuenta para clasificar con precisión los tamaños de estas estructuras. Comprender las relaciones entre los marcadores de fertilidad y las características fenotípicas externas puede llevar al desarrollo de técnicas para una fácil aplicación y bajo costo en el proceso de selección para la eficiencia reproductiva.

En bovinos, los ovarios más grandes están asociados con contaje de folículos antrales más grandes (Cushman *et al.*, 2009; Ireland *et al.*, 2011; Modina *et al.*, 2014). Ireland *et al.* (2008) reportaron que el mayor volumen de ovarios se asoció a mayor número de folículos en vacas Holstein. Un resultado similar fue informado por Eborn *et al.* (2013) en vaquillas Angus.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Ocurrió un incremento lineal de la producción de folículos, que estuvo asociado en la medida que aumentaron los niveles séricos de la AMH en las vaquillas Brahman con edad próxima a los 24 meses de edad. Además, se evidenció regresión que indica que a mayor niveles de la AMH aumentó el número de folículos totales y número de folículos entre 2 a 4 mm de diámetro.

Las vaquillas con niveles séricos de AMH superior a 300 pg/ml, con edades comprendidas entre 25 a 30 meses de edad reportaron el mayor número de folículos totales.

En vaquillas de edades comprendidas entre 25 a 30 meses de edad con niveles séricos superiores a 300 pg/ml de hormona antimülleriana se presentó la mayor cantidad de folículos con diámetros comprendidos entre de 2 a 4 mm.

La mayor cantidad de folículos con diámetros comprendidos entre 4,1 a 7 mm se presentaron en vaquillas de edades comprendidas entre 25 a 30 meses de edad con niveles séricos de 100 a 200 pg/ml de hormona antimülleriana.

Las vaquillas con edades comprendidas de entre 25 a 30 meses de edad presentaron el mayor valor de tamaño de ovarios.

5.2. RECOMENDACIONES

Utilizar la medición de los niveles AMH conjuntamente con la edad de la donadora, y la población folicular como referencia para seleccionar animales de elite genética para producción de embriones o de biotecnologías reproductivas.

Investigar en futuros trabajos la relación que pudiese existir entre los niveles de AMH y la época estacional del año en Ecuador.

Realizar investigaciones futuras para analizar la relación que pudiese existir entre los niveles de AMH y el status nutricional del animal.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A; Lichtman, A; Pillai, S. (2012). Técnicas de laboratorio usadas con frecuencia en inmunología, p 513- 514. Inmunología celular y molecular. 7ma Edición.
- Adams, G. 1998. Control of ovarian follicular wave dynamics in mature and prepubertal cattle for synchronization and superstimulation. In: Proceedings of the XX congress of the world association for buiatrics, 2:595–605.
- Adams, G; Rajesh, J; Jaswant, S; Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. Theriogenology. 69. 72-80. 10.1016/j.theriogenology.2007.09.026.
- Adams, G; Matteri, R; y Kastelic, J.1992. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. J. Reprod. Fert.94: 177-188.
- Adams, G. Nasser, L. Bó, G. Garcia, A. Del Campo, M. Mapletoft, R. 1994. Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. Theriogenology, 42:1103-1113.
- Aerts, J. y Bols, P. (2010). Ovarian Follicular Dynamics. A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects. Reprod Dom Anim 45, 180–187.
- Arthur, G.H. Veterinary reproduction and obstetrics. Fourth edition. London: BaillieréTindall, 1975. 616p.
- Ávila, L; Díaz, I; Villabona, P; Castañeda, J; Sotolongo, R; Villamil, J. 2018. Hormona antimülleriana como marcador de reserva ovárica en un centro de fertilidad. Disponible en Resúmenes de Trabajos Libres – XXXI Congreso Nacional de Obstetricia y Ginecología
- Baldrighi, J. Sá Filho, M.F., Batista, E.O., Lopes, R.N., Visintin, J.A., Baruselli, P.S., Assunção, M.E. 2014. Anti-Müllerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in murray heifers compared to holstein and gyr kept under the same management. Reprod. Domest. Anim. 49, 1015–1020.
- Baruselli, P.S.; Gimenes, L.U.; Sales, J.N.S. 2007. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 31, n.2, p.205-211.
- Baruselli, P; Batista, E; Vieira, L; Souza, A. 2015. Manipulación de la dinámica folicular y efectos del número de folículos y de la hormona antimülleriana (AMH) sobre la fertilidad. Formato PDF. Disponible en <http://www.iracbiogen.com>

- Batista, E., B. M. Guerreiro, B. G. Freitas, J. C. B. Silva, L. M. Vieira, R. M. Ferreira, R. G. Resende, A. C. Basso, R. N. V. R. Lopes, F. P. Rennó, A. H. Souza, and P. S. Baruselli. 2015. Plasma anti-Mullerian hormone as predictive endocrine marker for selection of *Bos taurus* (Holstein) and *Bos indicus* (Nelore) calves to in vitro embryo production. Submitted for publication.
- Batista, E. O. S., G. G. Macedo, R. V. Sala, M. Ortolan, M. F. Sá Filho, T. A. Del Valle, E. F. Jesus, R. Lopes, F. P. Rennó, and P. S. Baruselli. 2014a. Plasma Antimullerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) Heifers. *Reproduction in Domestic Animals* 49(3):448-452.
- Batista, E. O. S., G. G. Macedo, R. V. Sala, M. Ortolan, M. F. Sá Filho, T. A. Del Valle, E. F. Jesus, R. Lopes, F. P. Rennó, and P. S. Baruselli. 2014b. Plasma Antimullerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) Heifers. *Reprod. Domest. Anim.*:n/a-n/a.
- Benyei, B., A. Gáspárdy, S.C. Seh. 2003. Effect of the El Niño phenom on the ovarian responsive and embryo production of donor cows. *Acta Vet Hung.* 51(2):209-218.
- Bhide P, Homburg R. 2016. Anti-Müllerian hormone and polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*; S1521–6934: 30002–30005.
- Bó, G. 2002. Dinámica folicular y tratamientos hormonales para sincronizar la ovulación en el ganado bovino. XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Valera, Venezuela.
- Borges, A; Torres, C; Ruas, J; Rocha, V; y Carvalho, G. 2001. Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 53(5): 595-604. Versión en línea ISSN 1678-4162
- Braden TD, Gamboni F, and Niswender GD. 1988. Effects of prostaglandin F-induced luteolysis on the populations of cells in the ovine corpus luteum. *Biol Reprod*, 39:245.
- Burns, D.S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Knight, P.G., Ireland, J.J., 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle evidence for high variation among animals very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.* 73, 54–62.
- Center, K., Dixon, D., Looney, C., y Rorie, R. 2018. Anti-mullerian hormone and follicle counts as predictors of superovulatory response and embryo production in beef cattle. *Advances in Reproductive Sciences*, 6(01), 22.

- Climent, S., Sarasa, M., Muniesa, P., Terrado, J., & Climent, M. (2012). *Embriología y anatomía veterinaria*. Zaragoza, España: ACRIBIA, S.A.
- Cushman, R.A., Allan, M.F., Kuehn, L.A., Snelling, W.M., Cupp, A.S., Freetly, H.C. 2009. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *J. Anim. Sci.* 87, 1971–1980.
- De Ondiz Sánchez, F. Perea Ganchou, R. Cruz Arámbulo, G. Portillo Martínez y E. Soto Belloso. 2002. Evaluación ultrasonográfica del crecimiento del folículo ovulatorio en vacas anéstricas mestizas Cebú post-tratamiento con Norgestomet y eCG. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 10(1): 20-23.
- Del Río A. A., Nieto V. E., Sánchez C. M., Zamorano A. R., Torres S. J., Méndez C. M., Acosta B, S., Torres G. A. y Luna N. P. 2017. La hormona anti-mulleriana como un marcador endócrino asociado a la fertilidad postparto en Vacas Holstein. *La Sociedad Académica*, 49, 50-56.
- Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M. Balzarini, L. González, M. Tablada y C. Robledo. 2017. *InfoStat versión 2017*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Díaz, P; Stangaferro, M; Rey, F; Gareis, N; Matiller, V; Salvetti, N; Barberis, F; Quercia, E; Ortega, H. 2013. Determinación de hormona anti-mülleriana (AMH) en líquido folicular de bovinos con folículos persistentes inducidos y enfermedad quística ovárica espontánea. *ICiVet-Litoral (UNL-CONICET)*. Disponible en X Simposio Internacional De Reproducción Animal – Irac 2013.
- Durlinger, A., J. Visser, and A. Themmen. 2002. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* 124(5):601-609.
- Eborn, D.R., Cushman, R.A., Echterkamp, S.E., 2013. Effect of postweaning diet on ovarian development and fertility in replacement beef heifers. *J. Anim. Sci.* 91, 4168–4179.
- Erickson, B. H., R. A. Reynolds, and R. L. Murphree. 1976. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. *Biol. Reprod.* 15:555–560.
- Evans, A.C.O., Mossa F., Fair T., Lonergan P., Butler S.T., Zielak-Steciwko A.E., Smith G.W., Jimenez-Krassel F., Folger J.K., Ireland J.L.H., Ireland J.J. 2010. Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl*, 67:421–429
- Evans, A., F. Mossa, S. Walsh, D. Scheetz, F. Jimenez-Krassel, J. Ireland, G. Smith, and J. Ireland. 2012. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reprod. Domest. Anim.* 47(s4):31-37.

- Figueiredo, R; Barros, C; Pinheiro, O; Soler, J. (1997). Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) CATTLE. *Theriogenology*. 47. 1489-505. 10.1016/S0093-691X(97)00156-8.
- Forde, N; Beltman, M; Lonergan, P; Diskin, M; Roche, J; Crowe, M. (2010). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal reproduction science*. 124. 163-9. 10.1016/j.anireprosci.2010.08.025.
- Fortune, J. E., M. Y. Yang, and W. Muruvi. 2010. In vitro and in vivo regulation of follicular formation and activation in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 23(1):15-22.
- Fricke, P. y Shaver, R. (2001). Manejando trastornos reproductivos en Vacas Lecheras. Departamento de Ciencias Lácteas Universidad de Wisconsin-Madison 1675 Observatory Drive Madison, WI 53706
- Gougeon, Alain. (1996). Regulation of Ovarian Follicular Development in Primates: Facts and Hypotheses. *Endocrine reviews*. 17. 121-55. 10.1210/edrv-17-2-121.
- Coutinho, G; Viana, J; Sá, W; Camargo, L; Ferreira, A; Palhão, P. y Nogueira, L. 2007. Avaliação ultra-sonográfica da dinâmica folicular e lútea em vacas da raça Guzerá. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. vol.59(5): 1089-1096.
- Gan, S. D.; Patel K. R. (2013). Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology* 133.
- García-Guerra, A., Motta, J. C., Melo, L. F., Kirkpatrick, B. W., & Wiltbank, M. C. (2017). Ovulation rate, antral follicle count, and circulating anti-Müllerian hormone in Trio allele carriers, a novel high fecundity bovine genotype. *Theriogenology*, 101, 81-90.
- Gigli, I; Russo, A; Agüero, A. 2006. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *Revista In. Vet. InVet*. 2006, 8(1): 183-204. Buenos Aires, AR. p 196-198
- Ginther, O; Kastelic, J; Knopf, L. 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular wave. *J. Reprod Fertil*, 87: 223-230.
- Giraldo, C.A.; Z.T. Ruiz, L.F. Restrepo y M. Olivera. 2005. Interrupción temporal del amamantamiento (ITA) en vacas Cebú y su efecto en la función ovárica. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET* 6(12): 1-11.
- Gobikrushanth, M., Purfield, D. C., Colazo, M. G., Butler, S. T., Wang, Z., y Ambrose, D. J. 2018. The relationship between serum anti-Müllerian hormone concentrations and fertility, and genome-wide associations for anti-Müllerian hormone in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 101:1–12.
- González, K. 2017. La raza de ganado Brahman. CO. (En Línea). Consultado, 22 de oct. 2017. Disponible en <http://zoovetespasion.com>

- Guerreiro, B. M., E. O. S. Batista, L. M. Vieira, M. F. Sá Filho, C. A. Rodrigues, A. Castro Netto, C. R. A. Silveira, B. M. Bayeux, E. A. R. Dias, F. M. Monteiro, M. Accorsi, R. N. V. R. Lopes, and P. S. Baruselli. 2014. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domestic Animal Endocrinology* 49(0):96-104.
- Henao, G, A.M. Olivera and J.G. Maldonado. 2000. Follicular dynamics during postpartum anestrus and the first estrous cycle in sukled or non-sukled Brahman (*Bos indicus*) cows. *Animal Reproduction Science* 63: 127-136.
- Henao, G. 1998. Descripción y comparación del restablecimiento del ciclo estral postparto en vacas Brahman sin y con amamantamiento en el trópico colombiano. Tesis Magister en Ciencias Reproducción Animal. Universidad de Antioquia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Medellín. 28 p.
- Henao, G. 2010. Algunos factores relacionados con la dinámica folicular en bos indicus. *Revista. Fac. Nac. Agron. Medellín*, Volumen 63, Número 2, p. 5577-5586. ISSN electrónico 2248-7026. Medellín, CO.
- Henao, G. y L.E. Trujillo. 2003. Dinámica folicular durante la gestación temprana: estudio de un caso en *Bos indicus*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín* 56 (1): 1779-1788.
- Henao, G. y V. González. 2008. Relación de la variación del peso vivo y de la condición corporal con la dinámica folicular posparto en vacas cebú primerizas. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín* 61(1): 4394-4399.
- Henao, G.; L.E. Trujillo y J.F. Vásquez, 2002. Actividad ovárica posparto de vacas Cebú en amamantamiento. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín* 55(1): 1285-1302.
- Hernández, C. 2012. Fisiología clínica de la reproducción de bovinos lecheros. Desarrollo folicular. Delegación Coyoacán México D.F. pp. 20-24.
- Hirayama, H. S. Kageyama, A. Naito, S. Fukuda, T. Fujii, A. Minamihashi. 2012. Prediction of Superovulatory Response in Japanese Black Cattle Using Ultrasound, Plasma Anti-Müllerian Hormone Concentrations and Polymorphism in the Ionotropic Glutamate Receptor AMPA1/GRIA1. *J Reprod Dev.* 58(3):380-3.
- Hunter, M. G., Robinson, R. S., Mann, G. E., & Webb, R. (2004). Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 461–477.
- Ireland, J. Smith, G. Scheetz, D. Jimenez-Krassel, F. Folger, J. Ireland, J.L., Mossa, F. Lonergan, P. Evans, A. 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on

ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reproduction Fertility and Development*, 23 (1):1-14.

- Ireland, J. (1987). Control of follicular growth and development. *Journal of reproduction and Fertility. Supplement*. 34. 39-54.
- Ireland J.L.H., Scheetz D., Jimenez-Krassel F., Themmen A.P.N., Ward F., Lonergan P., Smith G.W., Perez G.I., Evans A.C.O. y Ireland, J.J. 2008. Antral Follicle Count Reliably Predicts Numbers of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle. *Biology of Reproduction*. 79:1219-1225.
- Ireland, J.J., F. Ward, F. Jimenez-Krassel, J.L. Ireland, G.W. Smith, P. Lonergan, A.C. Evans. 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod*. 22:1687–1695.
- Jimenez-Krassel, F., D. Scheetz, L. Neuder, J. Ireland, J. Pursley, G. Smith, R. Tempelman, T. Ferris, W. Roudebush, and F. Mossa. 2015. Concentration of antiMüllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. *J. Dairy Sci*. 98(5):3036-3045.
- Kevenaar, E., M. Meerasahib, P. Kramer, B. M. van de Lang-Born, F. de Jong, N. Groome, A. Themmen, and J. Visser. 2006. Serum anti-müllerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology* 147(7):3228-3234.
- Koizumi, M., y Kadokawa, H. 2017. Positive correlations of age and parity with plasma anti-Müllerian hormone concentrations in Japanese Black cows. *Journal of Reproduction and Development*, 63(2), 205-209.
- Lundy, T. Smith, P. O`Connell, A. Hudson, N. McNatty, K. 1999. Populations of granulose cells in small follicles of the sheep ovary. *J Reprod Fert*, 115:251-262
- Lussier, J. G., P. Matton, and J. J. Dufour. 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fertil*. 81:301–307.
- Machado, R; M.A.C.M. Bergamaschia, R.T. Barbosa, C.A. de Oliveira, M. Binelli. 2008. Ovarian function in Nelore (*Bos indicus*) cows after post-ovulation hormonal treatments. *Theriogenology* 15(7): 798-804.
- Maculan, R.; Pinto, T. L. C.; Moreira, G. M.; de Vasconcelos, G. L.; Sanches, J. A.; Rosa, R. G.; Bonfim, R.; Gonçalves, T. y de Souza, J. C. 2018. Anti-Müllerian Hormone (AMH), antral follicle count (AFC), external morphometrics and fertility in Tabapuã cows. *Animal reproduction science*, 189, 84-92.

- Martinez, F.M., Sanderson, N., Quirke, L.D., Lawrence, S.B., Juengel, J.L., 2015. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. *Theriogenology* 85, 1–10.
- Melado, L. 2014. Dinámica de la hormona antimülleriana durante los tratamientos de fiv-icsi y su correlación con las tasas de gestación. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Menendez, C. y Lilue, M. 2014. Instituto Palacios. Obtenido de Instituto Palacios: <http://institutopalacios.com/fertilidadyhormonaantimülleriana-ham-para-que-me-la-puede-pedir-mi-medico/>
- Modina, S., Tessaro, I., Lodde, V., Franciosi, F., Corbani, D., Luciano, A.M., 2014. Reductions in the number of mid-sized antral follicle are associated with markers of premature ovarian senescence in dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 26, 235–244.
- Monniaux, D; Di Clement, F; Dalbie-Tran, R; Estienne, A; Fabre, S; Mansanet, C. 2014. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? *Biol Reprod* 2014; 90 (85):1-11.
- Monniaux, D., Di Clemente, N., Touzé JI., Belville, C., Rico, C., Bontoux, M., Picard, J.Y. Y Fabre, S. 2008. Intrafollicular steroids and anti - Müllerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol. Reprod.* 79, 387-396
- Monniaux, D., L. Drouilhet, C. Rico, A. Estienne, P. Jarrier, J. Touze, J. Sapa, F. Phocas, J. Dupont, R. Dalbies-Tran, and S. Fabre. 2012. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. *Reprod. Fertil. Dev.* 25:1–16.
- Mora, H., C. O. 2005. Evaluación de la edad al primer parto y su incidencia en la vida productiva y reproductiva de las novillas Brahman. Trabajo de grado. Universidad de La Salle. Facultad de Zootecnia. Bogotá, Colombia. 73 pp.
- Moreira V. J.H., A. De Moraes F., W. Ferreira De Sa e L.S. De Almeida C. 2000. Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesquisa Agropecuária Brasileira.* 35(12): 2501-2509.
- Morotti, F., Santos, G. M. G., Júnior, C. K., Silva-Santos, K. C., Roso, V. M., & Seneda, M. M. (2017). Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in beef heifers. *Theriogenology*, 91, 21-26.
- Mossa, F; Jimenez-Krassel, J; Scheetz, D; Weber-Nielsen, M; Evans, A; Ireland, J. 2017. Anti-Müllerian Hormone (AMH) and fertility management in agricultural species. *Reproduction* (Cambridge, England). 154. 10.1530/REP 17-0104.

- Mossa, F. e Ireland, J. 2018. Anti-Müllerian Hormone (AMH). Elsevier. Encyclopedia of Reproduction (Second Edition). Vol. 2, 2018, Pages 222-226
- Mossa, F., F. Carter, S. W. Walsh, D. A. Kenny, G. W. Smith, J. L. Ireland, T. B. Hildebrandt, P. Lonergan, J. J. Ireland, and A. C. O. Evans. 2013. Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. *Biol. Reprod.* 88:92.
- Mossa, F., Walsh, S. W., Butler, S. T., Berry, D. P., Carter, F., Lonergan, P. y Evans, A. C. O. 2012. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *Journal of dairy science*, 95(5), 2355-2361.
- Motta, P; Ramos, N; Gonzales, C; Castro, E. 2011. Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *Revista Arq. Bras. Med. Vet. Zootec; vet.zootec.* 5(2): 88-99, 2011. Florencia, CO. p 91 - 95
- Murphy, B. 2011. Reserva folicular. Centro de investigación en reproducción animal, Facultad de Medicina Veterinaria. Université de Montréal, St-Hyacinthe Qc Canada J3N1M2
- Peña, C., M. C., y Correa C., D. A. 2018. Respuesta superovulatoria asociada a los niveles de hormona antimülleriana en vacas donadoras. Trabajo de grado. Maestría en Ciencias en Sistemas de Producción Animal. Universidad Autónoma de Baja California. 65 p.
- Perea, G., F; González F., Rumualdo; Cruz A., Robert; Soto B., Eleazar; Rincón U., Edmundo; González S., Carlos y Villamediana M., P. 1998. Evaluación ultrasonográfica de la dinámica folicular en vacas y novillas mestizas. *Revista Científica FCV/LUZ* 8(1): 14-24.
- Pérez, J.F.N. y Llinás E.L. 2003. Síndrome de persistencia del conducto de Müller. Unidad de Urología, Clínica Infantil Colsubsidio. Bogotá, Colombia. :73-83.
- Pérez, R.E. 2012. Factor 9 de crecimiento y diferenciación asociado al índice de prolificidad en la oveja pelibuey. Tesis de posgrado. Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, Edo. De México. :1-42.
- Pfeiffer, K; Jurado, L; Larson, J. 2014. Determination of anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. *Domestic Animal Endocrinology.* 46:58-64.
- Pierson, R. y Ginther, J. 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* 21(3): 495-504.
- Pierson, R. y Ginther, O. 1987. Ultrasonographic appearance of the bovine uterus during the estrous cycle. *J. Vet. Med. Assoc.*, 190:995-1002, 1987.

- Piltonen, T., L. Morin-Papunen, R. Koivunen, A. Perheentupa, A. Ruokonen, and J. S. Tapanainen. 2005. Serum anti-Müllerian hormone levels remain high until late reproductive age and decrease during metformin therapy in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 20(7):1820-1826.
- Pinheiro, O.L.; Barros, C.M.; Figueiredo, R.A. et al. Estrus behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F₂ α or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*, v.49, p.667-681, 1998.
- Rajakoski, E. 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with especial reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrinológica, Copenhage* 34 (Suppl. 3): S7-S68.
- Rajesh S.J. 2007. Regulation of follicular wave pattern in cattle. Thesis PhD. University of Saskatchewan, Saskatoon SK, Canada, 169 pp.
- Rajakoski, E. (1960). The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Acta endocrinologica. Supplementum*. 34(Suppl 52). 1-68.
- Rathbone M.J., Kinder J.E., Fike K., Kojima F., Clopton D., Ogle C.R., Bunt CR. 2001. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Adv Drug Deliv Rev*, 50: 277-320.
- Rhodes, F.M., G. D'Ath and K.W. Entwistle. 1995. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Animal Reproduction Science* 38(4): 265-277.
- Rhodes, F; Fitzpatrick, L; Entwistle, K. 1995b. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. *Scientific Magazine. Journal of Reproduction and Fertility*, v.104, p 41-49.
- Ribeiro, E; Bisinotto, R; Lima, F; Greco, L; Morrison, A; Kumar, A; Thatcher, W; Santos, J. 2014. Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *American Dairy Science Association*. 97:6888-6900
- Rico, C. Drouilhet, L. Salvetti, P. Dalbiès-Tran, R. Jarrier, P. Touzé, J. Pillet, E. Ponsart, C. Fabre, S. Monniaux, D. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reprod Fertil Dev* 2012; 24: 932-944.
- Rico, C., Fabre, S., Médigue, C., Clemente, N. D., Clément, F., Bontoux, M., Touzé, J.; Briant, E.; Rémy, B.; Beckers, J. F. y Monniaux D. 2009. Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-

- responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biology of reproduction*, 80(1), 50-59.
- Rico, C., S. Fabre, C. Médigue, N. d. Clemente, F. Clément, M. Bontoux, J.-L. Touzé, M. Dupont, E. Briant, B. Rémy, J.-F. Beckers, and D. Monniaux. 2009. Anti-Müllerian Hormone Is an Endocrine Marker of Ovarian Gonadotropin-Responsive Follicles and Can Help to Predict Superovulatory Responses in the Cow. *Biology of Reproduction* 80(1):50-59.
- Roa, N; Linares, T; Díaz, T. and Chacin, F. 2006. Ondas foliculares ováricas en vacas Brahman y Mestizas (*Bos indicus* x *Bos taurus*), ubicadas en los llanos centrales venezolanos. *Zootecnia Trop.* v.24(3): 297-306.
- Roberts, S.J. *Veterinary obstetrics and genital diseases*. 1971. Second edition. Ithaca-NY: Ed. Edwards brothers inc, 1971. p. 343-375.
- Rocha, A., Lima, V., Olazia, N., Nair, B., Cabral, C., Viana, S., Ribeiro, P. y Figueiredo J. 2010. Bone Morphogenetic Protein-6 (BMP-6) induces atresia in goat primordial follicles cultured in vitro. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 30:770-776.
- Roche, J. Control and regulation of folliculogenesis. 1996 a symposium in perspective. *Reviews of Reproduction* 1, 19–27
- Rojas, P; Recabarren M.P., Palma S., Maliqueo M., Carrasco A., Sir-Petermann T. y Recabarren SE. 2014. Morfometría ovárica y expresión del ARN mensajero de hormona antimülleriana (AMH), receptor de FSH (FSHR) y factor nuclear kappa B (NFkB) en folículos en crecimiento de borregas expuestas prenatalmente a testosterona. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 46:13-21.
- Ruiz-Cortés, Z.T. and M. Olivera-Ángel. 1999. Ovarian follicular dynamics in suckled zebu (*Bos indicus*) cows monitored by real time ultrasonography. *Animal Reproduction Science* 54(4): 211-220.
- Sartorelli E.S, L.M. Carvalho, D.R. Bergfelt, O.J. Ginther and C.M. Barros. 2005. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology* 63(9): 2382-2394.
- Schams, D. (1987). Luteal peptides and intercellular communication. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement. 34. 87-99.
- Senger P.L. 1997. Embryogenesis of the pituitary gland and male or female reproductive system. In: *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Current Conception Inc., 1:8-76.
- Silva, F. y Azevedo C. 2016. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *Afr. J. Agric. Res.* 11(39): 3733-3740.

- Singh J., Dominguez M., Jaiswal R., Adams G.P. 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology*, 62:227-243.
- Sirois, J. and Fortune J.E. 1988. Ovarian follicular dynamics during the oestrus cycle in heifers monitored by real time ultrasonography. *Biology of Reproduction*. 39: 308-317.
- Souza, A., P. Carvalho, A. Rozner, L. Vieira, K. Hackbart, R. Bender, A. Dresch, J. Verstegen, R. Shaver, and M. Wiltbank. 2015. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *Journal of dairy science* 98(1):169-178.
- Staigmiller, R. y England, B. 1982. Folliculogenesis in the bovine. *Theriogenology* v.17, Issue 1, p. 43-52
- Tríbulo, A. 2015. Superovulación de vacas donantes de embriones utilizando una o dos aplicaciones de hormona folículo estimulante. Tesis. Doctorado en Ciencias Agropecuarias. UNC. Córdoba, AR. p 1 - 8
- Walsh, S., F. Mossa, S. T. Butler, D. P. Berry, D. Scheetz, F. Jimenez-Krassel, R. J. Tempelman, F. Carter, P. Lonergan, and A. C. Evans. 2014. Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. *J. Dairy Sci.* 97(7):4503-4511.
- Webb, R; Garnsworthy, P; Gong, J; Armstrong, D. (2004). Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*. 82 E-Suppl. E63-74. 10.2527/2004.8213_supplE63x.
- XI Simposio internacional de Reproducción Animal – IRAC 2015. (2015, Córdoba, Argentina). Manipulación de la dinámica folicular y efectos del número de folículos y de la hormona antimülleriana (AMH) sobre la fertilidad. Córdoba, AR. p 43 - 72
- XXXI Congreso Nacional de Obstetricia y Ginecología. (2018, Cartagena, Colombia). Hormona antimülleriana como marcador de reserva ovárica en un centro de fertilidad. Cartagena, CO. p 62

ANEXOS

ANEXO 1. Selección de animales



ANEXO 2. Separación de animales por rango de edad



ANEXO 3. Chequeo por Ultrasonografía rectal



ANEXO 4. Observación del procedimiento



ANEXO 5. Fármacos utilizados



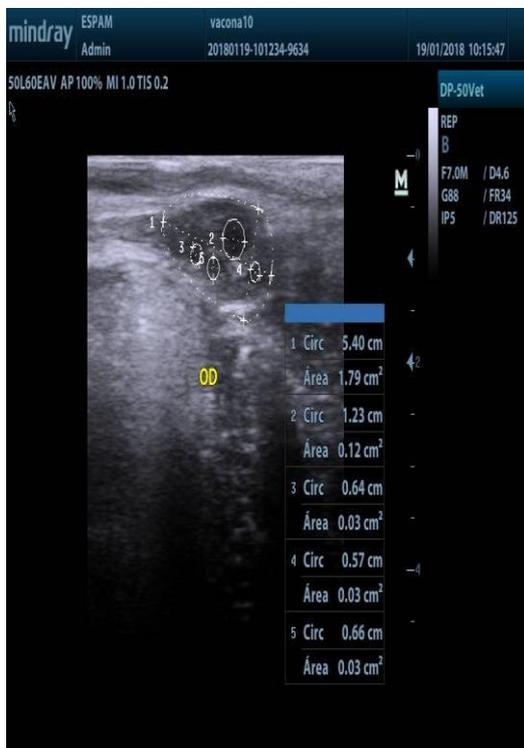
ANEXO 6. Obtención de la muestra de sangre por punción de la yugular.



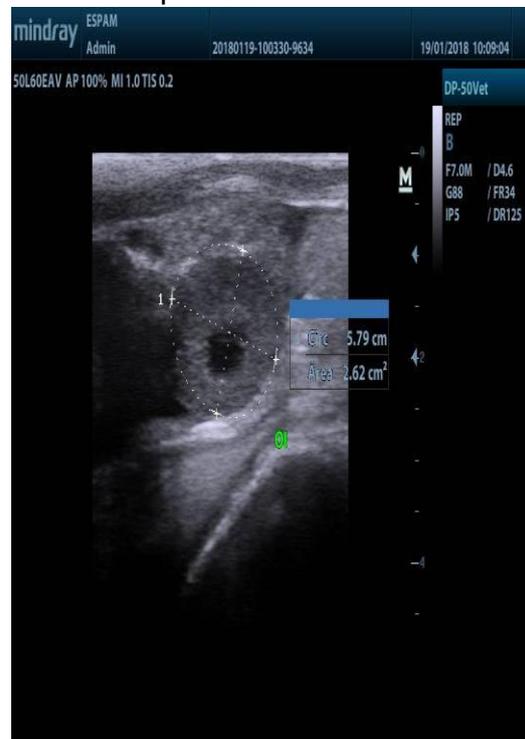
ANEXO 7. Ecografía del ovario derecho.



ANEXO 8. Conteo folicular en el ovario derecho



ANEXO 9. Ecografía del ovario izquierdo



ANEXO 10-A. Resultados de la prueba de ELISA para determinación de niveles de AMH por cada vacuilla.

UnimEVET
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
Manuel Luzurraga 211 y Panamá. (Ed. CETIC Of. 403)

No. A057-2018 al 076-2018

SOLICITADO POR: Dr. Jorge Ignacio Macías Andrade FECHA: 26/01/2018

Fecha de recepción de muestras: 15/01/2018
Tipo de muestras: SUERO BOVINO
Diagnóstico de: ANTI-MULLERIAN HORMONE (AMH) BOVINE

Resultados:

Cod. Interno	Cod. Remitente	Cod. EIA	Average ODvalue	pg/ml	ng/ml	Cualitativo
57	Vaca 01	1501-01	0,129	167,5	0,16753247	normal
58	Vaca 02	1501-02	0,176	228,6	0,22857143	normal
59	vaca 03	1501-03	0,112	145,5	0,14545455	normal
60	vaca 04	1501-04	0,19	246,8	0,24675325	normal
61	vaca 05	1501-05	0,209	271,4	0,27142857	normal
62	vaca 06	1501-06	0,194	251,9	0,25194805	normal
63	vaca 07	1501-07	0,237	307,8	0,30779221	normal
64	vaca 08	1501-08	0,529	687,0	0,68701299	alto
65	vaca 09	1501-09	0,198	257,1	0,25714286	normal
66	vaca 10	1501-10	0,137	177,9	0,17792208	normal
67	vaca 11	1501-11	0,272	353,2	0,35324675	normal
68	vaca 12	1501-12	0,135	175,3	0,17532468	normal
69	vacona 14-01	1501-13	0,209	271,4	0,27142857	normal
70	vacona 13	1501-14	0,194	251,9	0,25194805	normal
71	vacona 170-09	1501-15	0,262	340,3	0,34025974	normal
72	vacona 12-01	1501-16	0,166	215,6	0,21558442	normal
73	vaca cacho derretido	1501-17	0,16	207,8	0,20779221	normal
74	vacona 10-01	1501-18	0,143	185,7	0,18571429	normal
75	vaca 719	1501-19	0,181	235,1	0,23506494	normal
76	vacona s/n brahman	1501-20	0,152	197,4	0,1974026	normal

Valores de referencia: 0-100 pg/mL = bajo
100-400 pg/mL = normal
400+ pg/mL = alto

Nota: *Sírvase relacionar con datos clínicos.*

Atte,
UNIMEVET

ANEXO 10-B. Resultados de la prueba de ELISA para determinación de niveles de AMH por cada vacuilla.

UnimEVET
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
Manuel Luzurraga 211 y Panamá. (Ed. CETIC Of. 403)

No. A085-2018 al 104-2018

SOLICITADO POR: Dr. Jorge Ignacio Macías Andrade FECHA: 02/02/2018

Fecha de recepción de muestras: 22/01/2018
Tipo de muestras: SUERO BOVINO
Diagnóstico de: ANTI-MULLERIAN HORMONE (AMH) BOVINE

Resultados:

Cod. Interno	Cod. Remitente	Cod. EIA	pg/ml	ng/ml	Cualitativo
085-2018	Vacona 14	2201-21	172,7	0,1727	normal
086-2018	Vacona 03	2201-22	222,1	0,2221	normal
087-2018	Vacona 08	2201-23	513,0	0,513	alto
088-2018	Vacona 12	2201-24	314,3	0,3143	normal
089-2018	Vacona 09	2201-25	293,5	0,2935	normal
090-2018	Vaca 06-020	2201-26	237,7	0,2377	normal
091-2018	Vaca 02	2201-27	227,3	0,2273	normal
092-2018	Vaca aura	2201-28	188,3	0,1883	normal
093-2018	Vacona 10	2201-29	140,3	0,1403	normal
094-2018	Vacona 13	2201-30	241,6	0,2416	normal
095-2018	Vaca 07	2201-31	351,9	0,3519	normal
096-2018	Vaca cachoncita Nelore	2201-32	190,9	0,1909	normal
097-2018	Vaca chivo	2201-33	239,0	0,2390	normal
098-2018	Vaca 04	2201-34	171,4	0,1714	normal
099-2018	Vaca 170-09	2201-35	276,6	0,2766	normal
100-2018	Vacona 11	2201-36	342,9	0,3429	normal
101-2018	Vaca Penlacaro	2201-37	220,8	0,2208	normal
102-2018	Vaca 06	2201-38	340,3	0,3403	normal
103-2018	Vaca 01	2201-39	262,3	0,2623	normal
104-2018	Vaca 05	2201-40	484,4	0,4844	alto

Valores de referencia: 0-100 pg/mL = bajo
100-400 pg/mL = normal
400+ pg/mL = alto

Nota: *Sírvase relacionar con datos clínicos.*

Atte,
UNIMEVET

ANEXO 11. Resultados del análisis de varianza para Número total de folículos

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	P-valor
Edad	1	61,65	61,65	0,49	0,4966
Rango HAM	2	693,46	346,73	2,75	0,1009
Edad*Rango_HAM	2	1049,26	524,63	4,16	0,0401
Error	14	1638,67	126,05		

ANEXO 12. Resultados del análisis de varianza para número de folículos de 2 a 4 mm (datos transformados raíz X+1)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	P-valor
Edad	1	39,6	39,6	0,3	0,5955
Rango_HAM	2	716,57	358,28	2,68	0,1061
Edad*Rango_HAM	2	1216,51	608,25	4,55	0,0318
Error	14	1738,42	133,72		

ANEXO 13. Resultados del análisis de varianza para número de folículos de 4,1 a 7 mm (datos transformados raíz X+1)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	P-valor
Edad	1	0,08	0,08	1,48	0,2451
Rango_HAM	2	0,21	0,11	1,87	0,1927
Edad*Rango_HAM	2	0,39	0,2	3,45	0,0629
Error	14	0,74	0,06		

ANEXO 14. Resultados del análisis de varianza para número de folículos mayores a 7 mm (datos transformados raíz X+1)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	P-valor
Edad	1	0,11	0,11	1,26	0,2823
Rango_HAM	2	0,12	0,06	0,69	0,5183
Edad*Rango_HAM	2	0,49	0,24	2,78	0,0991
Error	14	1,14	0,09		

ANEXO 15. Resultados del análisis de varianza para tamaño del cuerpo lúteo [datos transformados Log₁₀(X+10)]

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Calculada	P-valor
Edad	1	0,01	0,01	0,51	0,487
Rango_HAM	2	0,03	0,02	1,25	0,3178
Edad*Rango_HAM	2	0,03	0,01	1,12	0,357
Error	14	0,16	0,01		