

Relación de la hormona anti-mülleriana con la cantidad y calidad de ovocitos colectados por aspiración ecoguiada en vaquillas Holstein

Relationship of anti-müllerian hormone with the quantity and quality of oocytes collected by ultrasound-guided aspiration in Holstein heifers

Jorge Dután^{1,2} , Jorge Samaniego¹ , Fernando Perea³ , Hugo Hernández-Fonseca⁴ , José Luis Pesántez¹ , Andrés Jácome¹ ,
Gabriela Garay¹  y Luis Ayala^{1*} 

¹Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Cuenca, Ecuador.

²Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Doctorado en Ciencias Veterinarias. Maracaibo, Venezuela.

³Universidad de Los Andes, Departamento de Ciencias Agrarias. Trujillo, Venezuela.

⁴St. George's University, School of Veterinary Medicine, Anatomy, Physiology and Pharmacology Department. St. George's, Granada.

*Autor para correspondencia: luis.ayala@ucuenca.edu.ec

RESUMEN

El experimento tuvo dos fases, la primera determinó la relación entre el recuento de folículos antrales (RFA) y la concentración de la hormona anti-mülleriana (AMH) valorada el día de reinicio de la onda folicular en 61 vaquillas Holstein mestizas, criadas en ganaderías del trópico alto del Ecuador. La segunda fase comparó el RFA valorado el día de la aspiración ecoguiada (OPU); así como, la cantidad y calidad de los complejos *cumulus* ovocito (COCs) recuperados en animales con alta (n=8) y baja (n=8) concentración de AMH. La sincronización de la onda folicular en la primera fase se realizó con benzoato de estradiol más un implante de progesterona intravaginal (DIV) y prostaglandina (PG). El RFA y la toma de las muestras de sangre en la primera fase del experimento se realizó el día 11 del protocolo. Se establecieron valores de corte de AMH mayores a 0,12 ng·mL⁻¹ para el grupo de alta y de 0,05 ng·mL⁻¹ para el grupo de baja concentración de AMH. La concentración de AMH el día 0 (inicio de la onda folicular) fue de 0,13 ± 0,01 ng·mL⁻¹, con un RFA de 17,31 ± 0,69 folículos y una correlación alta y positiva entre la AMH y el RFA de r=0,93; P<0,001. En la segunda fase del experimento se observó que las vaquillas con alta concentración de AMH presentaron el doble de folículos y COCs comparadas con las de baja concentración; sin embargo, el porcentaje de recuperación fue similar (57 %) en los dos grupos. Se ratificó la existencia de una correlación alta y positiva entre el RFA y la concentración de la AMH; además, se observó una relación fuerte entre la AMH y la cantidad y calidad de COCs recuperados por OPU. Vaquillas con más de 12 ng·mL⁻¹ deberían ser seleccionadas como donadoras de ovocitos, pues proporcionaron el doble de COCs aptos para la producción de embriones *in vitro* (PIVE), lo cual influirá en la cantidad y calidad de embriones obtenidos al final de la PIVE.

Palabras clave: Hormona anti-mülleriana; vaquillas; Holstein; trópico alto; folículos

ABSTRACT

The experiment had two phases, the first one determined the relationship between the antral follicle count (AFC) and the concentration of Anti-Müllerian hormone (AMH) valued on the day the follicular wave restarted in 61 crossbred Holstein heifers, raised on farms, from the high tropics of Ecuador. The second phase compared the AFC assessed on the day of ultrasound-guided aspiration (OPU); as well as the quantity and quality of Cumulus Oocyte Complexes (COCs) recovered in animals with high (n=8) and low (n=8) concentrations of AMH. Follicular wave synchronization in the first phase of the study was performed with estradiol benzoate plus an intravaginal progesterone (IVD) and prostaglandin (PG) implant. The AFC and the taking of the blood samples in the first phase of the experiment were carried out on day 11 of the protocol. AMH cut-off values of greater than 0.12 ng·mL⁻¹ were established for the high AMH group and 0.05 ng·mL⁻¹ for the low AMH concentration group. The AMH concentration on day 0 (start of the follicular wave) was 0.13 ± 0.01 ng·mL⁻¹, with an AFC of 17.31 ± 0.69 follicles and a high and positive correlation between AMH and the AFC of r=0.93; P<0.001. In the second phase of the experiment, it was observed that the heifers with a high concentration of AMH had double the number of follicles and COCs compared to those with a low concentration; however, the recovery rate was similar (57 %) in the two groups. The existence of a high and positive correlation between AFC and AMH concentration was confirmed; Furthermore, a strong relationship was observed between AMH and the quantity and quality of COCs recovered by OPU. Heifers with greater than 12 ng·mL⁻¹ should be selected as oocyte donors, since they provided double the COC's suitable for the production of embryos *in vitro* (PIVE), which will influence the quantity and quality of embryos obtained at the end of the PIVE.

Key words: Anti-müllerian hormone; heifers; Holstein; high tropics; follicles

INTRODUCCIÓN

Las condiciones medioambientales del trópico alto del Ecuador (2.500 metros sobre el nivel del mar –msnm–) y la adaptación que han logrado los bovinos de genotipo Holstein mestizos en esta región, han provocado cambios en su fisiología ovárica [3, 5]. Característica que podría alterar la relación entre la concentración de la hormona anti-mülleriana (AMH) y el recuento de folículos antrales (RFA) descritos en condiciones diferentes [28] como en el trópico húmedo [6], seco [1] y en regiones con cuatro estaciones [16], tanto en *Bos indicus* [25], como en *Bos taurus* [27]. Particularidad que pone en duda la utilización de los puntos de corte de la AMH existentes hasta el momento, para la selección de animales con alto RFA requeridos para la producción de embriones, mediante las técnicas combinadas de aspiración folicular ecoguiada (OPU) y la producción *in vitro* de embriones (PIVE) [6].

La hipótesis se fortalece ya que en pisos altitudinales elevados (sobre los 2.500 msnm) se produce hipoxia hipobárica, la cual afecta la función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, generando problemas en la esteroidogénesis, esto influye a su vez en el número y crecimiento de los folículos disponibles en los ovarios de los ovinos [18]. Y si bien, no existe información en la especie bovina sobre el efecto de la hipoxia, se ha descrito cambios en la fisiología ovárica del bovino Criollo en la sierra del Ecuador, incluyendo disminución en el RFA precisamente en regiones semejantes a las del presente estudio [3]. Un menor RFA provocaría disminución en la concentración de AMH en estos animales, esto debido a que la AMH es producida específicamente por las células de la granulosa de folículos pequeños en crecimiento [14], por lo tanto, animales con menor cantidad de folículos antrales (FA) presentarán menor concentración de AMH.

Además, se ha descrito que terneras nacidas de madres con restricción nutricional del 60 % en los primeros 110 días de gestación, presentaron un RFA ($15,8 \pm 1,8$ folículos), y una concentración de AMH menor a la observada en crías de madres sobrealimentadas con un 120 % del requerimiento nutricional ($23,6 \pm 1,9$ folículos) [15]. En efecto, una nutrición deficiente en las madres impacta negativamente sobre el RFA y los niveles de AMH en su descendencia [19]. En este contexto, es importante considerar que el valor energético de los pastos en el trópico alto es reducido, lo cual afectaría el RFA en estos animales [22].

Por lo tanto, se considera que los valores de corte de la AMH y su relación con el RFA, el número y calidad de COCs recuperados por la técnica de OPU en vaquillas de genotipo Holstein mestizo, criadas bajo condiciones climáticas de trópico alto y alimentadas al pastoreo podría ser diferente a los determinados para esta raza en condiciones de manejo y ambientales diferentes.

En consecuencia, se plantearon dos objetivos: (1) determinar si las vaquillas de genotipo Holstein mestizas criadas sobre los 2.500 msnm presentan correlación positiva entre el recuento de folículos antrales (RFA) y la concentración de la hormona anti-mülleriana (AMH) valorada el día de reinicio de la onda folicular. (2) comparar el número de folículos disponibles en los ovarios el día de la OPU; así como, la cantidad y calidad de COCs recuperados en vaquillas con alta y baja concentración de AMH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y granja

El estudio se realizó en 12 ganaderías comerciales, ubicadas en la región centro sur del Ecuador (sobre los 2.500 msnm). Estas se

encontraban en agroecosistemas con temperaturas entre 7 a 18°C, 80 % de humedad relativa, pluviosidad anual de 800 a 2.000 milímetros (mm). Los hatos poseían un sistema de manejo extensivo controlado mediante cerca eléctrica (Electrificador B/12, GEMI 39, Electrónica, Francia), alimentación a base de pasturas mezcla de gramíneas (*Pennisetum clandestinum* y *Lolium multiflorum*), leguminosas (*Trifolium pratense*, *Trifolium repens*), concentrado comercial y sales minerales.

Se seleccionaron 61 vaquillas de genotipo Holstein mestizo de carácter lechero (cruce entre Holstein y Criollo), peso promedio de $394,9 \pm 1,9$ kilogramos (kg), condición corporal (CC) de $2,6 \pm 0,03$, escala de 1–5, según lo descrito por Song y col. [26], y edad media de $19,9 \pm 0,18$ meses. Este estudio se realizó cumpliendo la normativa del código sanitario para animales terrestres, capítulo 7.8 “Utilización de animales en la investigación y educación”, de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) [17].

Diseño experimental

El experimento fue dividido en dos fases, en la primera se determinó la relación y asociación existente entre la AMH y el RFA en un momento determinado del ciclo estral (inicio de onda folicular) luego de aplicar un protocolo de sincronización del celo (FIG. 1).

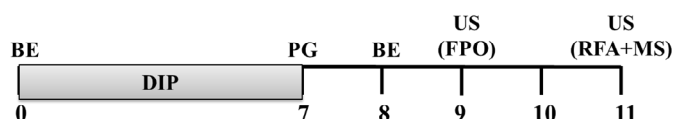


FIGURA 1. Protocolo de valoración de la concentración de hormona anti-mülleriana y recuento de folículos antrales. BE: benzoato de estradiol 2 miligramos (mg). DIP: dispositivo intravaginal de liberación de progesterona -P4- (1,9 g). PG: prostaglandina (25 mg). US: ecografía. FPO: folículo preovulatorio. MS: toma de muestra de sangre. RFA: recuento de folículos antrales < 4 mm

Las 61 vaquillas en estudio fueron agrupadas en animales con alta, media y baja concentración de AMH, y en base a esta clasificación se determinó el número de folículos antrales (RFA) en cada uno de los grupos.

En la segunda fase se seleccionaron 8 vaquillas con alta concentración (Tratamiento 1 –T1–) y 8 con baja concentración de AMH (Tratamiento 2 –T2–) del total de los 61 animales valorados en el experimento 1. A cada grupo experimental se les realizaron 4 sesiones OPU.

Determinación de la concentración plasmática de la hormona anti-mülleriana (AMH)

En la mañana del día 11 del protocolo (FIG. 1) se colectó una muestra sanguínea en tubos al vacío con ácido etilenodiaminetetraacético (EDTA, Vacutainer®), mediante punción de la vena coccígea. Inmediatamente las muestras fueron centrifugadas (Hettich, Micro 200, Alemania) a 3.000 gravedades (G) por 10 minutos (min) y el plasma obtenido se retiró y almacenó en alícuotas a -20 °C (Refrigeradora INDURAMA RI 405 CR, Ecuador), hasta el posterior análisis de la AMH. La concentración plasmática de AMH fue determinada mediante el kit ELISA, (kit DL-AMH-b, Develop®, China), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la prueba se basó en la intensidad del color a una longitud de onda de 450 nanómetros (nm). El kit de acuerdo

con el fabricante presentó una sensibilidad del ensayo inferior a 0,117 nanogramos-mililitro⁻¹ (ng·mL⁻¹).

Formación de grupos de alta, media y baja concentración de AMH

Una vez determinada la concentración plasmática de AMH de cada una de las 61 vaquillas en estudio, éstas fueron divididas en tres grupos en base a la concentración de AMH: grupo de alto nivel de AMH (> 0,12 ng·mL⁻¹; n=16), grupo con nivel medio de AMH (0,06 – 0,12 ng·mL⁻¹; n=25) y grupo de bajo nivel de AMH ($\leq$ 0,05 ng·mL⁻¹; n=20), de acuerdo a la metodología descrita por Ribeiro y col. [19]; Souza y col. [27], quienes realizaron terciles con la finalidad de que los animales de alta y baja concentración de AMH quedaran separadas por los animales con características combinadas del grupo clasificado como de nivel medio de AMH.

Sesiones de OPU

Se evaluaron 8 vaquillas con alto (0,31 $\pm$ 0,009 ng·mL⁻¹; T1) y 8 con nivel bajo (0,04 $\pm$ 0,001 ng·mL⁻¹; T2) niveles de AMH. A cada vaquilla de T1 y T2 se aplicó 4 sesiones de OPU.

Para sincronizar la onda folicular antes de la primera sesión de OPU, se realizó ablación de todos los folículos mayores a 5 mm en los dos ovarios de las vaquillas; las sesiones de OPU se realizaron cada 96 horas (h) a partir de este momento.

Preparación de las vaquillas para las sesiones de OPU

Los animales fueron colocados en una manga (Brete PLUS, Ecuador) cumpliendo las normas de bioseguridad, tanto del operador como del animal. La parte posterior de la vaquilla fue lavada con agua y amonio cuaternario al 10 %. Luego se aplicó por vía epidural (última sacra y primera coccígea) una mezcla de lidocaína al 2 % (Roxicaina®) y xilacina al 2 % (Dormi-xyI®).

Valoración y aspiración de los folículos disponibles en cada sesión de OPU

Los ovarios se visualizaron mediante ecografía (Prosound 2, Aloka, Japón) y se contaron todos los folículos con diámetro entre 4 y 8 mm. Luego se procedió a la aspiración transvaginal de los folículos utilizando un escáner de ultrasonido portátil (Prosound 2, Aloka, Japón), equipado con un transductor sectorial de 5 megahertz (MHz) ensamblado en un soporte de sonda. Para la punción se utilizó una aguja hipodérmica desechable (1,2 x 75 mm) conectada en un extremo a un tubo cónico de 50 mL y el otro a una bomba de vacío (WTA BV 003D, Brasil) con una presión regulada a 70 mm de mercurio (mm·Hg).

Se usó solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con 0,06 miligramos (mg)·mL⁻¹ de penicilina (mg·mL⁻¹) y heparina 10 unidades internacionales (UI) como medio de recolección de COCs, que se mantuvo a 37°C mientras se realizaba la OPU.

Inmediatamente después de cada sesión de OPU, el contenido del tubo fue depurado en un filtro EmCon (Zona™ Agtech, EUA) y luego transferido a una placa Petri. La búsqueda y clasificación de los COCs se realizó en un estereoscopio (SMZ 745, Nikon, Japón), en base a los criterios previamente descritos [9]. Brevemente, COCs de calidad A: apariencia compacta, con múltiples capas (más de 4 capas) de células de *cumulus*, citoplasma granular uniforme y transparente; calidad B: con 1 a 3 capas de células del *cumulus* que cubrían la zona pelúcida, con citoplasma opaco, total o parcialmente homogéneo y finamente granulado; calidad C: parcial o totalmente desnudos, citoplasma con áreas oscuras irregulares; calidad D: células del *cumulus* completamente expandidas y decoloradas. Finalmente, los COCs fueron agrupados en aptos (calidad A y B) y no aptos (calidad C y D) según lo descrito por Ayala y col. [4].

Análisis estadístico

Los datos fueron tabulados en Excel y el análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS® versión 25 [13]. La concentración de la hormona anti-mülleriana de las 61 vaquillas se expresó en medias y desviación estándar, así como sus valores mínimos y máximos. Para determinar la correlación entre el RFA y la AMH se utilizó la prueba de Pearson; además, se aplicó regresión lineal simple entre estas dos variables. Para comparar el número de folículos observados, ovocitos colectados y su calidad, primero se clasificó los ovocitos en aptos y no aptos dentro de cada uno de los tratamientos (T1=alta y T2=baja concentración de AMH), y a estos resultados obtenidos se aplicó la prueba de T de Student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración plasmática media de la AMH en el día de reinicio de la onda folicular (día 0) fue de 0,13 $\pm$ 0,01 ng·mL⁻¹, con un valor mínimo de 0,03 y máximo de 0,40 ng·mL⁻¹ (TABLA I). El valor plasmático de AMH reportado en el presente trabajo fue menor al descrito por Baldrighi y col. [5], quienes establecieron una concentración de 0,24 ng·mL⁻¹ para vaquillas Holstein criadas en condiciones de trópico bajo. Sin embargo, otros autores reportan concentración aún más altas de AMH (0,3 $\pm$ 0,03 ng·mL⁻¹) en las mismas condiciones tropicales [12].

En el presente estudio se determinó una media de 17,31 $\pm$ 0,69 folículos (rango 9-29 folículos; TABLA I), cuyos valores máximos fueron menores a

TABLA I
Valores descriptivos de los niveles de la hormona anti-mülleriana, del recuento de folículos antrales, y algunas características de las en vaquillas Holstein mestizas del estudio

Variable	N	X	DE	Mínimo	Máximo
Hormona anti-mülleriana (ng·mL ⁻¹)	61	0,13	0,11	0,03	0,40
Recuento de folículos antrales (n)	61	17,31	5,36	9,00	29,00
Condición corporal (1-5)	61	2,64	0,26	2,25	3,00
Peso (kg)	61	394,9	15,4	350,00	425,00
Edad (meses)	61	19,95	1,38	17,00	24,00

N=número de vacas. X= valor medio. DE=desviación estándar

los reportados por Baldrighi y col. [5] quienes establecieron un promedio de 35,9 folículos, con valor mínimo de 18 y un valor máximo de 110 folículos para animales de raza Holstein. A pesar de que son animales de un mismo genotipo en los dos estudios, la diferencia en el número de FA menores o iguales a 4 mm es el doble, lo cual afecta la concentración de AMH, ya que esta hormona es producida específicamente en las células de la granulosa de los folículos pre-antrales y FA pequeños en crecimiento [14].

También, se encuentra descrito que el número y crecimiento de FA pequeños, puede verse afectado por alteraciones en las concentraciones de hormonas metabólicas inducidos por cambios agudos en la ingesta de nutrientes [23, 24, 29], cambios que son recurrentes en la zona en estudio, pues el valor energético de los pastos es reducido y variable [22]. Este sistema de alimentación al pastoreo propio de las ganaderías de la zona, por un lado afectaría a los animales que ingieren estas pasturas, pero además, provocarían un impacto negativo sobre el RFA y los niveles de AMH de su descendencia [19].

A pesar de las diferencias en los valores de corte de la AMH anteriormente analizados, se ratificó en el presente estudio la existencia de una correlación positiva y significativa con el número total de FA menores o iguales a 4 mm presentes en el reinicio de la onda folicular ($r=0,93$; $P<0,001$). Además, el 86 % de la variabilidad promedio del RFA podría ser explicado por el modelo de regresión lineal ajustado, mostrado en la FIG. 2 ($R^2=0,86$), donde se observa que animales con mayor población folicular al momento del reinicio de la onda, presentaron concentraciones superiores a $0,12 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AMH en plasma.

Estos resultados permiten corroborar la fuerte relación entre la AMH y el RFA establecido en la raza Holstein, descrito previamente por Rico y col. [20], quienes observaron una relación de $r=0,59$ ($P<0,001$) en vacas estabuladas. En animales con alimentación controlada, esta correlación se incrementó a un valor de $r=0,66$; $P<0,001$ [5]. En bovinos criados a nivel del mar, Gobikrushanth y col. [11] determinaron una mayor correlación ($r=0,79$; $P<0,001$), llegando a su valor más alto en animales estabulados y criados a nivel del mar ($r=0,80$; $P<0,001$) [6]. Previamente se encontró una correlación en vacas mestizas Holstein de 78,3 % ($P<0,0001$) entre el RFA y la concentración de AMH [2].

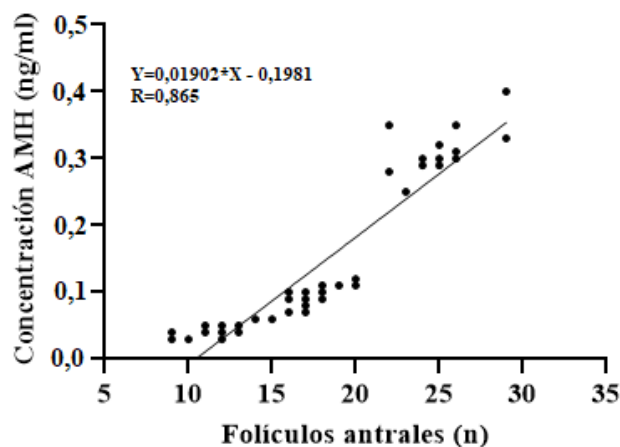


FIGURA 2. Asociación entre los niveles plasmáticos de la hormona anti-mülleriana (AMH) con el recuento de folículos antrales (RFA) en vaquillas Holstein mestizas

Al agrupar los animales de acuerdo la concentración de AMH en el presente estudio se determinó que el 32,9 % de animales ($n=20$) presentaron un nivel bajo de ($0,04 \pm 0,002 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) AMH; el 40,9 % ($n=25$; medio; $0,09 \pm 0,003 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) y el 26,2 % ($n=16$; alto; $0,31 \pm 0,009 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), con diferencia entre grupos ($P<0,05$; FIG. 3; Panel B). Igual comportamiento fue observado en el RFA de los grupos de bajo, medio y alto nivel de AMH ($11,6 \pm 0,36$; $17,1 \pm 0,30$; $24,8 \pm 0,52$ folículos respectivamente; FIG. 3; Panel A).

Las concentraciones de AMH y el RFA determinadas en el presente trabajo fueron similares a las observadas en vaquillas de genotipo Holstein agrupadas en animales con baja ($0,06 \pm 0,02 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; $13,4 \pm 1,40$ folículos) y alta ($0,57 \pm 0,26 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; $34,3 \pm 3,12$ folículos) concentración de AMH [6]. En un estudio previo, esta distribución en vacas Holstein mestizas fue de $>0,20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y un RFA de $39,61 \pm 2,3$ folículos en el grupo de alta concentración de AMH y en las de baja se observaron valores de $0,06 \pm 0,02 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $13,4 \pm 1,40$ folículos [2].

Sin embargo, difieren de los descritos por Guerreiro y col. [12], quienes encontraron valores de AMH superiores para el grupo de baja concentración ($0,2 \pm 0,01 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) y grupo de alta ($0,4 \pm 0,02 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) o los descritos por Baldrighi y col. [5] que observaron valores de $0,13 \pm 0,02 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (grupo de baja) y $0,54 \pm 0,11 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (grupo de alta), esta diferencia estaría relacionada con el número de folículos observados el día de la toma de la muestra de sangre para determinar los niveles de AMH, $24,1 \pm 1,3$ folículos (grupo de baja) y $68,5 \pm 17,5$ folículos (grupo de alta).

Si bien los valores medios en los grupos de baja y alta concentración de AMH difieren de los estudios citados, la correlación entre el RFA y la AMH los grupos de baja ($r=0,67$; $P<0,001$) y alta ($r=0,63$; $P<0,01$) concentración de AMH del presente estudio muestran valores consistentes con los observados en otros estudios.

La concentración de AMH puede utilizarse como un marcador endócrino para seleccionar donadoras de ovocitos, que permitan disponer de mayor cantidad de folículos disponibles para la aspiración

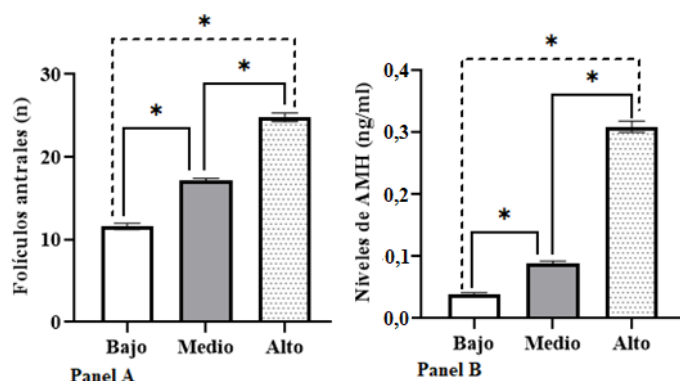


FIGURA 3. Recuento de folículos antrales (Panel A) y niveles plasmáticos de la hormona anti-mülleriana (AMH; Panel B), valorados el día de inicio de la onda folicular en vaquillas Holstein mestizas, clasificadas en tres grupos según el nivel de AMH en bajo, medio y alto. *: indican diferencia estadística significativa entre grupos experimentales $P<0,05$

Resultados de la OPU

El promedio general de FA entre 4–8 mm disponibles en el momento de la OPU (61 sesiones) fue de $17,3 \pm 0,84$, con un porcentaje de recuperación del 57,23 %, obteniendo $9,9 \pm 0,57$ COCs. Estos resultados son superiores a los reportados para vaquillas de este genotipo, en condiciones de trópico bajo, estabuladas y alimentadas con ración totalmente mezclada ($14,44$ folículos; 49,81 % de recuperación; 6,1 COCs) [8].

Al clasificar los animales en grupos con alta y baja concentración de AMH se determinó que las vaquillas con alta concentración de AMH presentaron el doble de folículos en el día de la OPU comparado con los animales con baja concentración de AMH, aunque en los dos grupos se obtuvieron similares porcentajes de recuperación de COCs (57 %). Además, al contar con un mayor número de folículos en el grupo de alta concentración de AMH se obtuvo el doble de COCs aptos para la producción de embriones *in vitro* (TABLA II).

Esta diferencia en cuanto a folículos disponibles para ser aspirados entre los grupos de alta y baja concentración de AMH, también,

fue observada en otros estudios al valorar vaquillas Holstein en condiciones medioambientales y de manejo diferentes (trópico bajo), en los cuales el grupo de alta AMH presentó $20,9 \pm 1,5$ folículos y una recuperación media de $17,3 \pm 1,5$ COCs (81,8 %); mientras que el grupo de baja AMH se observaron $13,6 \pm 0,9$ folículos y se obtuvieron $9,0 \pm 0,9$ COCs (64,7 %) [12]. Iguaes resultados fueron reportados por Ghanem y col. [10], quienes determinaron mayor disponibilidad de folículos y COCs recuperados en el grupo de alta ($20,40 \pm 1,63$ folículos) comparado con el grupo de baja ($12,19 \pm 0,72$ folículos) concentración de AMH; sin embargo, el porcentajes de recuperación de COCs fue diferente entre los dos grupos de alta (56,2 %) y baja (39,5 %; $P < 0,05$), factor que difiere con nuestro porcentaje de recuperación.

Estos resultados llevaron a determinar una correlación fuerte entre la concentración de AMH y el número de COCs recuperados ($r = 0,86$; $P < 0,001$), así como, con la calidad de COCs aptos obtenidos ($r = 0,78$; $P < 0,001$). Resultados que ratifican la correlación descrita ($r = 0,78$; $P < 0,001$) en vaquillas de Holstein criadas en el trópico bajo alimentadas con ración total mezclada [12].

TABLA II
Valores medios y error estándar de folículos aspirados, COCs recuperados y su clasificación obtenidos en las 61 sesiones de OPU (32 grupo de alta y 29 en el grupo de baja concentración de AMH)

Variables	Total (n=61)	Grupo alta (n=32)	Grupo baja (n=29)	P
Folículos aspirados/sesión	$17,3 \pm 0,84$	$23,2 \pm 0,41$	$10,8 \pm 0,35$	*
COCs recuperados/sesión	$9,9 \pm 0,57$	$13,4 \pm 0,56$	$6,2 \pm 0,27$	*
% de recuperación de COCs	57,23	57,75	57,41	ns
COCs Tipo A	$3,5 \pm 0,27$	$4,9 \pm 0,34$	$2,1 \pm 0,21$	*
COCs Tipo B	$3,0 \pm 0,24$	$4,1 \pm 0,33$	$1,9 \pm 0,19$	*
COCs Tipo C	$1,8 \pm 0,17$	$2,3 \pm 0,27$	$1,3 \pm 0,16$	*
COCs Tipo D	$1,6 \pm 0,19$	$2,2 \pm 0,29$	$0,9 \pm 0,19$	*
COCs Aptos (A+B)	$6,6 \pm 0,42$	$8,9 \pm 0,46$	$3,9 \pm 0,29$	*
COCs no Aptos (C+D)	$3,4 \pm 0,29$	$4,5 \pm 0,43$	$2,2 \pm 0,23$	*

COCs: complejo cumulus ovocito. Total: valores correspondientes al total de vaquillas en estudio. Grupo de alto: animales con mas de 20 folículos antrales. Grupo de bajo: animales con menos de 13 folículos antrales. *: diferencia estadística entre grupos de alto y bajo RFA. Prueba de T de Student al 5 %. ns: no significativo

Entre las tecnologías reproductivas existentes la combinación de las biotécnicas OPU-PIVE son herramientas importantes para la reproducción de material genético de calidad superior [21]. Sin embargo, la competencia de los ovocitos es uno de los factores limitantes más importantes encontrados durante la producción de embriones *in vitro* [7]. Por lo tanto, conseguir mayor número de COCs competentes (aptos) para ingresar al proceso de la PIVE es fundamental para incrementar el número de embriones obtenidos al final de este proceso.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que las vaquillas del grupo con alta concentración de AMH proporcionaron el doble de COCs aptos ($8,9 \pm 0,46$ COCs) en comparación con los obtenidos en el grupo de baja AMH ($3,9 \pm 0,29$ COCs; $P < 0,05$). Característica de este tipo de animales que fueron descritas en otras condiciones de manejo y ambientales [12]. Por lo tanto, seleccionar animales con alto RFA permitirá contar con mayor población de FA,

mayor cantidad de COCs aptos y esto influirá positivamente en los resultados de la producción de embriones *in vitro*.

CONCLUSIONES

Los puntos de corte de la AMH de estos animales, criados en condiciones de trópico alto y alimentados al pastoreo, difieren de los descritos para bovinos en otras condiciones ambientales y de manejo. Sin embargo, se ratifica la existencia de una correlación alta y positiva entre la concentración de la AMH y el RFA en el día del reinicio de la onda folicular, lo cual lleva a determinar que la AMH es biomarcador confiable para seleccionar animales con alto RFA, característica que permite obtener el doble de COCs aptos para la producción de embriones *in vitro*.

Conflicto de Interés

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] ABDEL, R.L.; KHALIL, A.A.Y.; ABDEL-WAHAB, A.; HASSAN, N.Y.; ABDEL-HAMIED, E.; KASIMANICKAM, R.K. Relationship among circulating anti-Müllerian hormone, insulin like growth factor 1, cadmium and superovulatory response in dairy cows. **Theriogenol.** 100: 72-79. 2017.
- [2] AYALA, L.; ASTIZ, S.; DUTAN, J.; SAMANIEGO, J.; LÓPEZ, R.; PEREA, F.; HERNANDEZ-FONSECA, H.; PESÁNTEZ, J. Relationship between the concentration of anti-Müllerian hormone and antral follicle count in pasture-managed Holstein cows in the high tropics. **J. Dairy Res.** 22: 1-5. 2022.
- [3] AYALA, L.; PESANTEZ, L.; RODAS, E.; DUTÁN, J.; CALLE, G.; MURILLO, Y.; VÁZQUEZ, J.; NIETO, P.; ORTEGA, V.; SAMANIEGO, J. Dinámica folicular de vaquillas Criollas al pastoreo en el altiplano ecuatoriano. **Arch. Zoot.** 68(262): 186-192. 2019.
- [4] AYALA, L.; SAMANIEGO, J.; ARGUDO, D.; PEREA, M.; PEREA, F.; RODAS, E.; NIETO, P. El intervalo de tiempo entre la estimulación ovárica con FSH/LH y la colecta afecta la cantidad, calidad y capacidad de desarrollo de los ovocitos recuperados de novillas criollas ecuatorianas. **Rev. Invest. Vet. Perú.** 31(1): e17571. 2020.
- [5] BALDRIGHI, J.; SÁ FILHO, M.F.; BATISTA, E.O.S.; LOPES, R.N.V.R.; VISINTIN, J.A.; BARUSELLI, P.S.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A. Anti-Müllerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. **Reprod. Dom. Anim.** 49(6): 1015-1020. 2014.
- [6] BATISTA, E.O.S.; MACEDO, G.G.; SALA, R.V.; ORTOLAN, M.D.D.V.; SÁ FILHO, M.F.; DEL VALLE, T.A.; JESUS, E.F.; LOPES, R.N.V.R.; RENNÓ, F.P.; BARUSELLI, P.S. Plasma antimüllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. **Reprod. Dom. Anim.** 49(3): 448-452. 2014.
- [7] BOLS, P.E.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; VANDENHEEDE, J.M.; DE KRUIF, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenol.** 45(5): 1001-1014. 1996.
- [8] ÇİZMECI, S.A.; DINC, D.A.; BUCAK, M.N.; ÇİFTCI, M.F.; YESILKAYA, Ö.F.; AGIR V. (2022). The effect of Anti-Müllerian hormone on yield of oocytes recovered by ovum pick-up (OPU) in heifers. **J. Adv. VetBio. Sci. Tech.** 7(2): 161-168. 2022.
- [9] DE LOOS, F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T.A.M. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Res.** 24(2): 197-204. 1989.
- [10] GHANEM, N.; JIN, J.I.; KIM, S.S.; CHOI, B.H.; LEE, K.L.; HA, A.N.; SONG, S.H.; KONG. The Anti-Müllerian Hormone Profile is Linked with the *in Vitro* Embryo Production Capacity and Embryo Viability after Transfer but Cannot Predict Pregnancy Outcome. **Reprod. Dom. Anim.** 51(2): 301-310. 2016.
- [11] GOBIKRUSHANTH, M.; DUTRA, P.A.; BRUINJÉ, T.C.; COLAZO, M.G.; BUTLER, S.T.; AMBROSE, D.J. Repeatability of antral follicle counts and anti-Müllerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. **Theriogenol.** 92: 90-94. 2017.
- [12] GUERREIRO, B.M.; BATISTA, E.O.S.; VIEIRA, L.M.; SÁ FILHO, M.F.; RODRIGUES, C.A.; CASTRO-NETTO, A.; SILVEIRA, C.R.A.; BAYEUX, B.M.; DIAS, E.A.R.; MONTEIRO, F.M.; ACCORSI, M.; LOPES, R.N.V.R.; BARUSELLI, P.S. Plasma anti-müllerian hormone: An endocrine marker for *in vitro* embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. **Dom. Anim. Endocr.** 49(1): 96-104. 2014.
- [13] IBM CORP. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp. RELEASED 2017.
- [14] MONNIAUX, D.; RICO, C.; LARROQUE, H.; DALBIÈS-TRAN, R.; MÉDIGUE, C.; CLÉMENT, F.; FABRE, S. L'hormone antimüllérienne, prédicteur endocrinien de la réponse une stimulation ovarienne chez les bovins. **Gynecol. Obst. Fert.** 38(7-8): 465-470. 2010.
- [15] MOSSA, F.; CARTER, F.; WALSH, S.W.; KENNY, D.A.; SMITH, G.W.; IRELAND, J.L.H.; HILDEBRANDT, T.B.; LONERGAN, P.; IRELAND, J.J.; EVANS, A.C.O. Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. **Biol. Reprod.** 88(4): 1-9. 2013.
- [16] NABENISHI, H.; KITAHARA, G.; TAKAGI, S.; YAMAZAKI, A.; OSAWA, T. Relationship between plasma anti-Müllerian hormone concentrations during the rearing period and subsequent embryo productivity in Japanese black cattle. **Dom. Anim. Endocr.** 60: 19-24. 2017.
- [17] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE). Código Sanitario para los Animales Terrestres. 19na. Ed. Paris. Pp 357. 2010.
- [18] PARRAGUEZ, V.H.; GONZALEZ-BULNES, A. Endocrinology of reproductive function and pregnancy at high altitudes. **Curr. Opinion Endoc. Metab. Res.** 11: 27-32. 2020.
- [19] RIBEIRO, E.S.; BISINOTTO, R.S.; LIMA, F.S.; GRECO, L.F.; MORRISON, A.; KUMAR, A.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. **J. Dairy Sci.** 97(11): 6888-6900. 2014.
- [20] RICO, C.; FABRE, S.; MEDIGUE, C.; CLEMENTE, N.D.; CLEMENT, F.; BONToux, M.; TOUZE, J.L.; DUPONT, M.; BRIANT, E.; REMY, B.; BECKERS, J.F.; MONNIAUX, D. Anti-Müllerian Hormone Is an Endocrine Marker of Ovarian Gonadotropin-Responsive Follicles and Can Help to Predict Superovulatory Responses in the Cow. **Biol. Reprod.** 80(1): 50-59. 2009.
- [21] RUIZ, S.; ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA, J.; ASTIZ, S.; PEINADO, B.; ALMELA, L.; POTO, A. Application of reproductive biotechnology for the recovery of endangered breeds: Birth of the first calf of murciana-levantina bovine breed derived by OPU, *in vitro* production and embryo vitrification. **Reprod. Dom. Anim.** 48(6): e81-e84. 2013.
- [22] SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.A.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenol.** 69(1): 88-97. 2008.
- [23] SARTORI, R.; GIMENES, L.U.; MONTEIRO, P.L.J.; MELO, L.F.; BARUSELLI, P.S.; BASTOS, M.R. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. **Theriogenol.** 86(1): 32-40. 2016.
- [24] SCARAMUZZI, R.J.; BROWN, H.M.; DUPONT, J. Nutritional and metabolic mechanisms in the ovary and their role in mediating the effects of diet on folliculogenesis: A perspective. **Reprod. Dom. Anim.** 45: 32-41. 2010.

- [25] SILVA, K.C.; SANTOS, G.M.G.; SILOTO, L.S.; SANTOS, J.T.; OLIVEIRA, E.R D.E.; MACHADO, F.Z.; ROSA, C.O.; SENEDA, M.M. The correlation between the number of antral follicles and ovarian reserves (preantral follicles) in purebred *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **Anim. Reprod. Sci.** 151(3-4): 119-125. 2014.
- [26] SONG, X.; BOKKERS, E.A.M.; VAN MOURIK, S.; GROOT-KOERKAMP, P.W.G.; VAN DER TOL, P.P.J. Automated body condition scoring of dairy cows using 3-dimensional feature extraction from multiple body regions. **J. Dairy Sci.** 102(5): 4294-4308. 2019.
- [27] SOUZA, A.H.; CARVALHO, P.D.; ROZNER, A.E.; VIEIRA, L.M.; HACKBART, K.S.; BENDER, R.W.; DRESCH, A.R.; VERSTEGEN, J.P.; SHAVER, R.D.; WILTBANK, M.C. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. **J. Dairy Sci.** 98(1): 169-178. 2015.
- [28] VERNUNFT, A.; SCHWERHOFF, M.; VIERGUTZ, T.; DIEDERICH, M.; KUWER, A. Anti-Mullerian hormone levels in plasma of Holstein-Friesian heifers as a predictive parameter for ovum pick-up and embryo production outcomes. **J. Reprod. Develop.** 61(1): 74-79. 2015.
- [29] WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **J. Anim. Sci.** 82: E63-E74. 2004.