



Concentración sérica de la hormona anti-Mülleriana y su relación con la reserva ovárica en vacas Brahman donantes de ovocitos

Diego A Riveros-Pinilla¹ ; Carolina Bernalhok-Jacometo¹ ; Juan D Corrales-Álvarez¹ ;
Julio C Olaya-Oyuela² ; Liliana Chacón-Jaramillo^{1*} .

¹Universidad de La Salle, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Bogotá, Colombia.

²Embriogenex SAS, Bogotá, Colombia.

*Correspondencia: lchacon@unisalle.edu.co

Recibido: Abril 2022; Aceptado: Agosto 2022; Publicado: Septiembre 2022.

RESUMEN

Objetivo. Evaluar la relación de la concentración sanguínea de AMH con el recuento folicular ovárico y la producción *in vitro* de embriones en hembras bovinas de la raza Brahman. **Materiales y métodos.** Para estandarizar la técnica de cuantificación de AMH se realizó un primer experimento, en el cual se tomaron muestras de sangre de 10 hembras Brahman sincronizadas en su celo, en tres días diferentes del ciclo estral, con más de 90 días posparto y con evaluación reproductiva normal. La concentración sérica de AMH se determinó con un *kit* inmunoenzimático comercial. Una vez estandarizada la técnica, se realizó un segundo experimento, se tomaron muestras de sangre de 100 donantes Brahman de ovocitos no sincronizadas, se realizó una sesión de aspiración folicular para la producción *in vitro* de embriones y se registró el número de folículos mayores de 2 mm en los dos ovarios. **Resultados.** No hubo diferencias en la concentración de AMH entre los días evaluados del ciclo estral y se encontró una correlación de 0,82 ($p < 0.001$) entre la población de folículos antrales (PFA) y la concentración de AMH. La concentración sérica de AMH osciló entre 0.02 y 2.69 ng/ml. Además, se encontró una correlación de 0.73 ($p < 0.001$) entre AMH y AFP y 0.54 entre AMH y el porcentaje de blastocistos producidos. **Conclusiones.** La AMH se puede utilizar como un marcador endocrino satisfactorio de la predicción de la reserva ovárica para la producción de embriones *in vitro* en ganado Brahman.

Palabras clave: Cebú; folículo; *in vitro*; marcador endocrino; transferencia embrionaria (*Fuente: MeSH*).

ABSTRACT

Objective. To evaluate the relationship of AMH blood concentration with ovarian follicular count and *in vitro* embryo production in female Brahman cattle. **Material and methods.** To standardize the AMH quantification for Brahman donors, experiment 1 was performed, blood samples were taken from 10 heat synchronized Brahman females, in three different days of the estrous cycle, with more than 90 days postpartum and with normal reproductive evaluation. Serum concentration of AMH was determined with a commercial immunoenzymatic kit. After the technique was standardized, blood samples were taken from 100 non-synchronized Brahman oocyte donors, an ovum pick-up session was performed for *in vitro* embryo production and the number of follicles greater than 2 mm in the

Como citar (Vancouver).

Riveros-Pinilla DA, Bernalhok-Jacometo C, Corrales-Álvarez JD, Olaya-Oyuela JC, Chacón-Jaramillo L. Concentración sérica de la hormona anti-Mülleriana y su relación con la reserva ovárica en vacas Brahman donantes de ovocitos. Rev MVZ Córdoba. 2022; 27(3):e2660. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2660>



©El (los) autor (es) 2022. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

two ovaries was registered. **Results.** There were no differences in AMH concentration between the evaluated days of estrous cycle and a correlation of 0.82 ($p < 0.001$) was found between antral follicle population (AFP) and AMH concentration. Serum AMH concentration ranged from 0.02 to 2.69 ng/ml in Brahman oocyte donors. Also, a correlation of 0.73 ($p < 0.001$) between AMH and AFP and 0.54 between the AMH and the percentage of blastocysts were found in donors. **Conclusions.** The AMH can be used as a satisfactory endocrine marker of ovarian reserve prediction for *in vitro* embryo production in Brahman cattle.

Keywords: Zebu; follicle; *in vitro*; endocrine marker; embryo transfer (*Source: MeSH*).

INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de aumentar la eficiencia del sistema ganadero bovino, las tecnologías de reproducción asistida bovina como la aspiración folicular u OPU (del inglés, *ovum pick-up*) y la producción de embriones *in vitro* (PEIV) son biotecnologías importantes para multiplicar el material genético de animales con superioridad reproductiva y productiva (1). Sin embargo, el éxito en la producción de embriones entre otros factores, depende de las características fisiológicas individuales de la hembra donante de ovocitos, la población de folículos antrales (PFA) en los ovarios, así como la calidad y cantidad de ovocitos (2,3,4). Las hembras mamíferas nacen con un número variable de folículos sanos en sus ovarios (5), que constituyen la reserva ovárica, a partir de la cual los folículos primordiales se activarán y reclutarán en el grupo de folículos en crecimiento para eventualmente sufrir atresia u ovulación (6).

La hormona Anti-Mülleriana, del inglés *Anti-Mülleriana hormone* (AMH), es una hormona glicoproteica, también llamada Müllerian-inhibiting substance (MIS), es miembro de la superfamilia de factores de crecimiento transformante beta - TGF- β (7).

En machos, esta hormona se secreta durante la fase fetal, en la diferenciación sexual (7); en las hembras la secretan las células de la granulosa en los folículos antrales pequeños, se ha reportado en diversas especies, como humana, bovina y ovina (8,9,10). En la vida adulta la AMH se secreta en la foliculogénesis, durante el proceso de reclutamiento y selección, de igual modo se ha demostrado que tiene la función de regular el crecimiento de los folículos, al participar en el control de la hormona folículo estimulante (7,11). Este patrón de expresión se evaluó por primera vez en roedores (12) y posteriormente en mujeres (13), hembras bovinas (14) y ovinas (15).

La AMH se considera un marcador endocrino excelente de la reserva ovárica a la estimulación con gonadotropina en humanos (16). Posteriormente, esta correlación se ha extendido a los animales de producción (17,18), de tal forma que este marcador puede predecir la PFA en ganado bovino (19,20,21). Estudios en diferentes razas bovinas como Holstein, Jersey, Gyr y Nelore muestran la relación que tiene la AMH sobre el número de folículos (17,19,22,23,24).

Se ha propuesto también la AMH como un marcador para predecir el desempeño de la PEIV en *Bos taurus* (25,26) y *Bos indicus*, como la raza Nelore (27,28,29). De esta forma, la AMH como marcador endocrino de la PFA, puede ser útil para seleccionar hembras donantes con alto potencial reproductivo y garantizar una mayor eficiencia en la producción de embriones (22,30).

Varios estudios (18,20,21,24) han señalado que una de las ventajas prácticas del uso de AMH sobre el conteo directo de folículos con ultrasonido para predecir AFP, es que los niveles de AMH pueden no presentar mayores variaciones durante el ciclo estral, por lo tanto, se pueden tomar muestras de sangre en cualquier momento del ciclo para evaluar las concentraciones circulantes de AMH, sin embargo, esto no se ha informado en vacas donantes Brahman.

A pesar de ser *Bos indicus*, la raza Brahman fue desarrollada por criadores norteamericanos, cruzando Guzerat, Nelore, Gyr y Krishna Valley, a finales del siglo XIX y principios del XX, con el objetivo de obtener una raza adaptada a las condiciones ambientales del trópico (31). En Colombia es la raza con mayor participación como raza pura de carne (97%) y con gran influencia en el ganado comercial (32). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la relación de las concentraciones sanguíneas de AMH con la reserva ovárica y la PEIV en vacas donantes de ovocitos de la raza Brahman en Colombia.

MATERIALES Y METODOS

Lugar de estudio. El presente estudio se desarrolló en fincas ubicadas en los municipios de Villavicencio, Granada, Cabuyaro, Yopal, Girardot, Oiba, Alvarado, Purificación y Espinal en Colombia.

Los análisis de laboratorio se realizaron en las instalaciones del Centro de Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción, y el laboratorio de Embriogenex SAS en la Universidad La Salle ubicados en Bogotá. El estudio contó con la aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Universidad La Salle (Aprobación #235 de 2017).

Estandarización de la técnica de AMH detectada en sangre en vacas Brahman (experimento 1). Se utilizaron diez vacas Brahman, donantes de ovocitos de un predio comercial ubicado en el municipio de Purificación, en el departamento del Tolima, Colombia. Las hembras tenían entre 4 y 5 años, multíparas, y al momento de los procedimientos experimentales tenían más de 90 días posparto, evaluación reproductiva normal, no estaban preñadas, y no presentaron patologías en sus dos ovarios.

Con el propósito de determinar si se presentan diferencias en la concentración en sangre de la AMH en el día del ciclo estral en que se encuentran las 10 hembras donantes, su celo fue sincronizado: en el día cero (d0) se insertó un dispositivo intravaginal de 1.0 g de progesterona natural (DIB 1.0, Syntex S.A., Buenos Aires, Argentina) y se aplicó 2 mg de benzoato de estradiol, im (Benzoato de Estradiol, Syntex S.A., Buenos Aires, Argentina) al tiempo de insertar el dispositivo. En el momento del retiro del dispositivo (d8) se aplicó 0.15 mg de Cloprostenol (Prostal®, Laboratorios Over, Santa Fé, Argentina) y 1 mg de cipionato de estradiol (Cipiosyn®, Syntex S.A., Buenos Aires, Argentina), im. Las muestras de sangre para determinar las concentraciones séricas de AMH se tomaron en los días 8, 13 y 23 con relación al día de la inserción del dispositivo, como día 0 (d0). El día de la toma de muestra de sangre se realizó ecografía transrectal con un ecógrafo portátil a través de un transductor convexo de 5-MHz (Mindray DP - 2200 VET, Shenzhen, China) y se determinó en los dos ovarios el número de folículos antrales visibles >2 mm de diámetro (33).

Las muestras de sangre se colectaron en un tubo de vacío que contenía EDTA mediante la

punción de la vena coccígea. Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta la separación del plasma sanguíneo por centrifugación a 3600 g durante 10 minutos y se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

Para evaluar las concentraciones de AMH en sangre se realizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con un *kit* comercial disponible para AMH bovina (AL-114; Ansh Labs, Webster, Tx, EEUU con una sensibilidad de 0.1 ng/ml y una detección límite de <0.078 ng/ml) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó un lector de microplacas (Mindray MR-96A). Para la estandarización, cada muestra se midió por triplicado y en tres ensayos diferentes para obtener los coeficientes de variación intraensayo e interensayo.

Determinación de AMH en donantes de ovocitos Brahman (experimento 2). Para este experimento, se seleccionaron vacas Brahman donantes de ovocitos (n=100), de un grupo de hembras en las que se realiza PEIV, de forma comercial con la empresa Embriogenex®. Todas las hembras tenían entre 4 y 7 años, multíparas, al momento de los procedimientos experimentales tenían más de 90 días posparto, evaluación reproductiva normal, no estaban preñadas, no presentaron patologías en sus dos ovarios y no fueron sometidas a sincronización de celo. Se tomaron muestras de sangre antes de iniciar la sesión comercial de OPU, siguiendo los mismos procedimientos descritos anteriormente.

Antes de las sesiones de OPU, se contaron todos los folículos antrales de ≥ 3 mm en ambos ovarios (34) utilizando una sonda transrectal de 5 MHz. En los procedimientos de OPU, se restringió el movimiento de las donantes en un brete y se les aplicó anestesia epidural (lidocaína al 2%) para facilitar el manejo de los ovarios. La zona perineal se limpió, secó y desinfectó con alcohol. Todos los folículos visibles se aspiraron a través de una aguja de aspiración (20 G; Terumo Europe NV, Bélgica) instalada dentro de una sonda transvaginal y conectada a un sistema de vacío (presión de vacío negativa de 85-90 mm Hg; V-MAR 5000, Cook Australia, Queensland, Australia). El líquido folicular se condujo a través de un circuito de manguera con diámetro interno de 1.1 mm y 120 cm de largo (Watanabe Tecnología Aplicada, WTA Ltda, Cravinhos, São Paulo, Brasil) conectado directamente a un tubo cónico de 50 ml que contenía 15 ml de solución salina fosfato tamponado de Dulbecco (DPBS; Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, São

Paulo, Brasil) y heparina sódica 5000 UI/ml, a 37°C. Los ovocitos se recuperaron y clasificaron en medio DPBS suplementado con suero bovino fetal al 1% y luego se transfirieron a tubos de 1.5 ml que contenían medio de transporte de ovocitos [TCM 199 con HEPES 25 mM y sales de Earle (M7528)] suplementado con suero bovino fetal al 10%, 49.4 mg/ml de piruvato de sodio (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, MO) y 50 mg/ml de gentamicina, y finalmente transportados al laboratorio en una incubadora a 38.5°C (Ref #19180/2101, Minitube, Verona, USA).

Los ovocitos de cada donante se cultivaron individualmente y se sometieron a procesos de maduración, fecundación y cultivo *in vitro* de embriones siguiendo los protocolos de laboratorio. El semen utilizado fue de dos toros.

Análisis estadístico.

Experimento 1. Para determinar el grado de relación entre la población de folículos antrales y las concentraciones de AMH en donantes de ovocitos Brahman, y la variación de la concentración de AMH durante el ciclo estral, se realizó un análisis de correlación y de medidas repetidas utilizando el software R versión 3.6.3.

Experimento 2. Para el análisis de los datos, todos los valores se probaron para distribución normal, utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se sometieron a estadística descriptiva y se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM) excepto para la correlación. Las concentraciones séricas de AMH de las 100 donantes de ovocitos Brahman se clasificaron en 3 grupos como AMH baja, intermedia y alta. El análisis estadístico de concentración de AMH, número de folículos y número de blastocistos se realizó mediante ANOVA, seguido de la prueba de Kruskal-Wallis, con un nivel de significación de 0.001. Los datos fueron analizados con el software R versión 3.6.3.

RESULTADOS

Experimento 1. En el presente estudio se determinó que no hubo diferencias significativas en las concentraciones de AMH circulante en los diferentes días del ciclo estral en las vacas de raza Brahman (Tabla 1). La técnica inmunoenzimática se validó, los resultados

indicaron un coeficiente de variación (CV) intraensayo de 6.36% y un CV interensayo de 8.31%. En las vacas donantes evaluadas durante el experimento 1 la concentración media de AMH fue de 0.580 ± 0.05 ng/ml. El recuento folicular medio fue de 22.27 ± 8.18 y la correlación entre la concentración de AMH y el recuento folicular fue alta ($r=0.82$; $p<0.001$).

Tabla 1. Concentración de AMH de donantes de ovocitos Brahman en diferentes días de la sincronización del estro (días 8, 13 y 23 en relación con el día de inserción del dispositivo como - d0).

Día de muestreo	Concentración de AMH (ng/ml)	Desviación estándar	Valor p
8	0.625	0.070	0.632
13	0.529	0.070	
23	0.581	0.070	

Experiment 2. Las concentraciones séricas de AMH del subconjunto de donantes Brahman con mayor número de ovocitos oscilaron entre 0.02 y 2.69 ng/ml. Las concentración media de AMH (\pm DE) y mediana fueron 1.12 ± 0.44 y 1.06 ng/ml, respectivamente. Las vacas clasificadas como bajas en AMH, que comprenden más del 20% de las muestras, tuvieron una media de 0.31 ng/ml y un rango de 0.02 a 0.67 ng/ml; las donantes clasificadas como AMH intermedia tenían una media de 0.93 ng/ml y oscilaban entre 0.74 y 1.48 ng/ml; y las clasificadas como AMH alta comprendieron más del 20% de las muestras, media 1.85 ng/ml y rango de 1.48 a 2.69 ng/ml (Tabla 2), presentaron diferencias significativas entre los rangos y los valores medios ($p<0.001$).

Table 2. Categorización de la AMH y conteo de folículos totales en donadoras de ovocitos Brahman.

Categorización de AMH (concentración media en ng/ml)	Conteo total de folículos (\pm SD)	Valor p
Alta (1.85)	32.80 ± 8.94^a	0.0001
Intermedia (0.93)	21.20 ± 4.30^b	
Baja (0.31)	18.20 ± 3.30^c	

La correlación entre la concentración de AMH y el número de folículos fue moderadamente alta (0.73) y significativa ($p<0.0001$) como se presenta en la Figura 1.

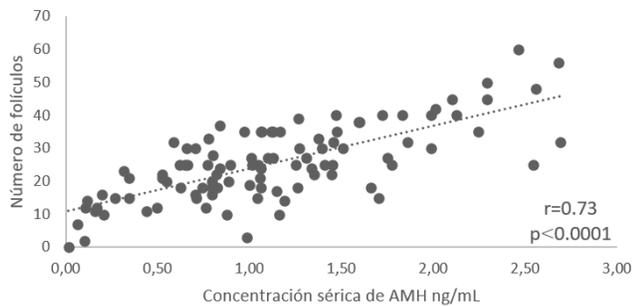


Figura 1. Correlación entre la concentración sérica de AMH y número de folículos en vacas Brahman donantes de ovocitos.

Se observó que a medida que avanzaba el proceso *in vitro*, la correlación entre AMH disminuyó en relación con el número de ovocitos recuperados (0.68), ovocitos que ingresaron al proceso de maduración (0.65), ovocitos que ingresaron al proceso de fecundación (0.60), embriones divididos (0.56) y blastocistos (0.54; Figura 2), sin embargo, estas correlaciones se consideran moderadas ($p < 0.001$).

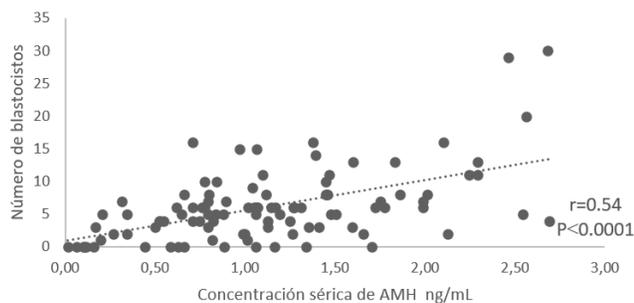


Figura 2. Relación entre las concentraciones séricas de AMH y el número de blastocistos en vacas Brahman donantes de ovocitos.

DISCUSIÓN

Para lograr la eficiencia productiva en los sistemas es fundamental buscar parámetros de selección que sean medibles, repetibles y que dependan lo menos posible de la apreciación individual a fin de reducir la subjetividad en los parámetros de selección de los animales que serán utilizados como reproductores y brindar características relevantes al rebaño, permitiendo que el sistema de producción sea más competitivo. En este sentido, el uso de AMH como herramienta de selección de hembras donantes puede ayudar en la detección de animales con mayor potencial como donantes de ovocitos para la aplicación de biotecnologías reproductivas.

Validación de la técnica de ELISA para detectar AMH en sangre en donadoras Brahman. Los coeficientes de variación intra e interensayo obtenidos fueron lo suficientemente bajos como para permitir el uso de la técnica ELISA en hembras bovinas, como una herramienta confiable, a través de la cual se pueden obtener resultados repetibles y por lo tanto ser utilizada como herramienta de selección de hembras de la raza Brahman que tienen una mayor reserva ovárica.

Estudios previos, con otras razas bovinas, han reportado comportamientos similares a los presentados en este estudio para la raza Brahman. Para Holstein x Normando, las concentraciones de AMH se reportaron entre el rango de 1.74 y 23.68 ng/ml, mostrando un coeficiente de variación intraensayo entre 3.4 y 11.3%, respectivamente (35). Así como concentraciones entre 0.033 y 0.125 ng/ml, para Holstein, con un coeficiente de variación interensayo entre 3.6 y 11.8% (25).

Relación entre la concentración de AMH y la población de folículos antrales. El número de folículos antrales es una característica importante en los procedimientos de biotecnología reproductiva, ya que es un indicador del potencial de producción de embriones *in vitro*. Nuestros resultados indican una fuerte correlación ($r=0.73$) entre el número de folículos y las concentraciones de AMH en donantes de ovocitos Brahman. Esta asociación puede deberse al hecho de que la AMH es secretada por las células de la granulosa en los folículos antrales pequeños, siendo similar a los informes previos de la literatura (8,9,10).

Se han realizado estudios que involucran mediciones de concentraciones AMH circulante en varias razas de ganado y algunas otras especies de producción, encontrando, por ejemplo, vacas Tabapuã, una raza brasileña *Bos indicus* para producción de carne, presentaron valores medios de 1.60 ng/ml, con rangos de 0.014 a 4.516 ng/ml (36) y una correlación positiva entre la concentración de AMH circulante y el número de folículos antrales. Aquellos animales considerados los más sobresalientes reproductivamente, con base a diferentes parámetros de su historia reproductiva y los que al momento del estudio presentaban un mayor conteo de folículos antrales, presentaron concentraciones medias de 1.15 ng/ml, los animales con una población folicular y producción de ovocitos intermedia presentaron una concentración media de 0.73

ng/ml, y aquellos individuos que históricamente presentaron menor producción tuvieron una concentración media de 0.44 ng/ml (36).

Otro estudio realizado, comparando las concentraciones de AMH en novillas Holstein y Gyr, sujetas a un protocolo de sincronización y con muestras recolectadas el día de la ovulación, encontró que las concentraciones medias de la AMH para *Bos indicus* (Gyr; 0.60 ± 0.09 ng/ml) fueron mayores que para *Bos taurus* (Holstein; 0.24 ± 0.08 ng/ml) (19). Además, la presente investigación demostró que, entre las razas, Brahman (*Bos indicus*) presentó una concentración de AMH más baja en comparación con Tabapuã y mayor que las reportadas para las razas Nelore y Gyr.

Para la raza Angus se encontró una concentración media de AMH de 0.070 ng/ml, en la Charolais de 0.041 ng/ml, y en la Holstein de 0.028 ng/ml, mientras que para la raza Jersey de 0.046 ng/ml, durante la sincronización de celo y ciclo estral natural (22), que demostraron ser valores mucho más bajos que los que encontramos para las vacas Brahman. Según otro estudio, la concentración media de AMH encontrada en vacas Holstein fue de 0.368 ng/ml, con un rango de 0.091 a 1.391 ng/ml (26).

Los resultados de esta investigación proporcionan evidencia que existe una correlación positiva entre la concentración sérica de AMH y el número de folículos antrales en las donantes de ovocitos de la raza Brahman. Estos resultados sugieren que la AMH podría ser un posible marcador endocrino a largo plazo de la actividad ovárica similar a los hallazgos informados por Mossa et al (33), quienes infieren que una sola muestra de sangre tomada en una etapa aleatoria del ciclo estral para medir la concentración de AMH podría considerarse un marcador fisiológico confiable para predecir el número relativo de folículos, contribuyendo a la selección de vacas con mayor potencial y resultados exitosos en biotecnologías reproductivas como OPU e IVEP. Además, hasta tenemos conocimiento, este trabajo es el primer estudio que reporta las concentraciones de AMH circulante en diferentes días del ciclo estral y su relación con la reserva ovárica en donantes Brahman para producción de embriones *in vitro*, lo que aporta nueva información sobre la fisiología reproductiva de esta raza.

Relación entre la concentración de AMH y la producción de embriones. En este estudio se encontró una correlación positiva moderada

entre las concentraciones de AMH en sangre y el número de embriones, lo que concuerda con lo obtenido en el trabajo experimental realizado por Monniaux et al (14), quienes observaron que existía una correlación positiva entre la concentración de AMH de vacas donantes y el número de embriones obtenidos. Las vacas con concentraciones plasmáticas de AMH entre 0.10 y 0.20 ng/ml y superiores a 0.20 ng/ml produjeron un mayor número de embriones transferibles que las vacas con concentraciones de AMH inferiores a 0.01 ng/ml.

Los resultados de este estudio también son similares a los de Batista et al (20), en los que se observó una correlación positiva entre la concentración plasmática y el número de blastocistos producidos a partir de terneras donantes Nelore ($r = 0.62$) y Holstein ($r = 0.58$).

En otro estudio de Guerreiro et al (28), las donantes clasificadas con niveles altos de AMH produjeron un número significativamente mayor de embriones en comparación con aquellas con niveles bajos de AMH.

La concentración de AMH circulante, se puede utilizar como indicador de la reserva ovárica, con la ventaja de permanecer constante en todas las fases del ciclo estral, sin afectarse por los protocolos de sincronización realizados en las hembras (20,35), lo cual fue confirmado en el presente estudio para vacas las Brahman.

Nuestros resultados también coinciden parcialmente con los obtenidos en el trabajo experimental realizado por Batista et al (20), en el que las vacas donantes fueron asignadas a diferentes grupos en función de la concentración de AMH, independientemente de la fase del ciclo estral de las vacas donantes. Estos autores, de igual forma observaron una correlación positiva entre la concentración de AMH de las vacas donantes y el número de folículos antrales por vaca.

Es esperable, la disminución de la concentración de AMH a lo largo del tiempo, ya que la reserva ovárica se reduce a medida que la hembra presenta más ciclos estrales, debido a una reducción del menor número de folículos, ya que esta hormona es secretada por las células de la granulosa de los folículos antrales de pequeño tamaño (21).

Se ha establecido una correlación positiva entre el número de ovocitos obtenidos en un protocolo de superovulación y su posterior aspiración y

los niveles plasmáticos de AMH. Vernunft et al (26), concluyeron que la técnica permite identificar grupos de vacas con potencial para ser buenas o malas donantes de ovocitos (lo que sugiere una herramienta potencial para seleccionar mejores donantes de ovocitos). Nuestros resultados indican que, si bien la AMH puede ser un indicador del número de ovocitos, no puede considerarse un indicador de la calidad o viabilidad de los embriones que puedan surgir de su fertilización *in vitro*. Estos logros podrían traducirse en protocolos en los que se esperaría obtener más ovocitos por aspiración folicular y así aumentar la tasa de éxito de la producción de embriones *in vitro*, reduciendo los intervalos generacionales, optimizando el uso de los recursos genéticos considerados valiosos por su potencial productivo y capacidad reproductiva, influyendo positivamente en la fertilidad en sistemas productivos dedicados a la comercialización de material genético.

Se han observado correlaciones entre concentraciones altas de AMH y algunos parámetros productivos en vacas. Se investigó la relación entre las concentraciones circulantes de AMH y la longevidad productiva en vacas Holstein. Sin embargo, según los autores, no fue posible encontrar una correlación entre estos dos parámetros, pero observaron que aquellos animales que tenían concentraciones más altas de AMH históricamente tenían un mejor y destacado desempeño reproductivo (37).

La concentración de AMH circulante es útil en la identificación de animales que probablemente tendrán una mejor respuesta a un tratamiento con gonadotropinas al realizar protocolos de superovulación o sesiones de OPU, siendo aquellas vacas con concentraciones más altas, las mejores donantes de ovocitos y las mejores candidatas para participar en programas PEIV (27). A futuro, con investigaciones complementarias aplicadas en campo, se podrán seleccionar animales utilizando sus niveles circulantes de AMH, ya que se esperaría que tengan un mayor

potencial reproductivo, e incluso aquellas vacas con mayores niveles circulantes de AMH sean más longevas y productivas.

En conclusión, nuestros datos demuestran que la AMH es un biomarcador factible para indicar la reserva ovárica y la eficiencia de producción de embriones *in vitro* en donantes Brahman. Según el conocimiento de los autores, este es el primer estudio que informa la correlación entre la concentración sérica de AMH en diferentes días del ciclo estral y la reserva ovárica en donantes de ovocitos Brahman, lo que proporciona nuevos conocimientos sobre la fisiología reproductiva y la respuesta a las biotecnologías reproductivas en esta raza.

Declaración de crédito de autoría y contribución. Diego A Riveros Pinilla: investigación, metodología, redacción borrador original, redacción - revisión y edición; Carolina Bepalhok Jacometo: investigación, metodología, análisis formal, redacción - revisión y edición, adquisición de fondos; Juan David Corrales Álvarez: metodología, análisis formal, redacción - revisión y edición, adquisición de fondos; Liliana Chacón Jaramillo: investigación, metodología, análisis formal, redacción - borrador original, redacción - revisión y edición, adquisición de fondos; Julio C Olaya Oyuela: redacción - revisión y edición, adquisición de fondos.

Declaración de conflictos de interés

Certificamos que no existe conflicto de intereses con ninguna organización financiera con respecto al material discutido en el manuscrito.

Agradecimientos

Este estudio fue parte de un proyecto macro, financiado por Minciencias (beca # 124377657045), Universidad de La Salle y Embriogenex.

REFERENCIAS

1. Morotti F, Sanches BV, Pontes JHF, Basso AC, Siqueira ER, Lisboa LA, et al. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology*. 2014; 81(5):696–701. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.12.002>
2. Pontes JHF, Melo FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KCP, et al. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*. 2011; 75(9):1640–1646. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.026>
3. Ireland J, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P, et al. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod*. 2007; 22(6):1687–1695. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem071>
4. Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Knight PG, Ireland JJ. Numbers of Antral Follicles During Follicular Waves in Cattle: Evidence for High Variation Among Animals, Very High Repeatability in Individuals, and an Inverse Association with Serum Follicle-Stimulating Hormone Concentrations. *Biol Reprod*. 2005; 73(1):54–62. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036277>
5. Block E. Quantitative morphological investigation of the system in women. *Acta Anat*. 1952; 14(1–2):108–123. <https://doi.org/10.1159/000140595>
6. Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancourt M-A, Dupont J, Fortune JE, et al. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod Fertil Dev*. 2011; 23(3):444–467. <https://doi.org/10.1071/RD09161>
7. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 1999; 140(12):5789–5796. <https://doi.org/10.1210/endo.140.12.7204>
8. Bezard J, Vigier B, Tran D, Mauleon P, Josso N. Immunocytochemical study of anti-Müllerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post-natal development. *Reproduction*. 1987; 80(2):509–516. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0800509>
9. La Marca A, Volpe A. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin Endocrinol*. 2006; 64(6):603–610. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02533.x>
10. Vigier B, Picard J-Y, Tran D, Legeai L, Josso N. Production of Anti-Müllerian Hormone: Another Homology between Sertoli and Granulosa Cells. *Endocrinology*. 1984; 114(4):1315–1320. <https://doi.org/10.1210/endo-114-4-1315>
11. Hayes E, Kushnir V, Ma X, Biswas A, Prizant H, Gleicher N, et al. Intra-cellular mechanism of Anti-Müllerian hormone (AMH) in regulation of follicular development. *Mol Cell Endocrinol*. 2016; 433:56–65. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.05.019>
12. Ueno S, Kuroda T, Maclaughlin DT, Ragin RC, Manganaro TF, Donahoe PK. Müllerian Inhibiting Substance in the Adult Rat Ovary During Various Stages of the Estrous Cycle. *Endocrinology*. 1989; 125(2):1060–1066. <https://doi.org/10.1210/endo-125-2-1060>
13. Weenen C, Laven JSE, Von Bergh ARM, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*. 2004; 10(2):77–83. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah015>

14. Monniaux D, Barbey S, Rico C, Fabre S, Gallard Y, Larroque H. Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? *Reprod Fertil Dev.* 2010; 22(7):1083-1091. <https://doi.org/10.1071/RD09279>
15. Veiga-Lopez A, Ye W, Padmanabhan V. Developmental programming: prenatal testosterone excess disrupts anti-Müllerian hormone expression in preantral and antral follicles. *Fertil Steril.* 2012; 97(3):748-756. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.12.028>
16. Kim JH, Seibel MM, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Ransil BJ, Hametz PA, et al. The inhibitory effects of müllerian-inhibiting substance on epidermal growth factor induced proliferation and progesterone production of human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 75(3):911-917. <https://doi.org/10.1210/jcem.75.3.1517385>
17. Monniaux D, Drouilhet L, Rico C, Estienne A, Jarrier P, Touzé J-L, et al. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. *Reprod Fertil Dev.* 2013; 25(1):1-16. <https://doi.org/10.1071/RD12270>
18. Rico C, Fabre S, Medigue C, Clemente ND., Clement F, Bontoux M, et al. Anti-Müllerian Hormone Is an Endocrine Marker of Ovarian Gonadotropin-Responsive Follicles and Can Help to Predict Superovulatory Responses in the Cow. *Biol Reprod.* 2009; 80(1):50-59. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072157>
19. Baldrighi J, Sá Filho M, Batista E, Lopes R, Visintin J, Baruselli P, et al. Anti-Müllerian Hormone Concentration and Antral Ovarian Follicle Population in Murrah Heifers Compared to Holstein and Gyr Kept Under the Same Management. *Reprod Domest Anim.* 2014; 49(6):1015-1020. <https://doi.org/10.1111/rda.12430>
20. Batista E, Macedo G, Sala R, Ortolan M, Sá Filho M, Del Valle T, et al. Plasma Antimüllerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) Heifers. *Reprod Domest Anim.* 2014; 49(3):448-452. <https://doi.org/10.1111/rda.12304>
21. Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JLH, et al. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in. *Reprod Fertil Dev.* 2011; 23(1):1-14. <https://doi.org/10.1071/RD10226>
22. Pfeiffer KE, Jury LJ, Larson JE. Determination of anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. *Domest Anim Endocrinol.* 2014; 46(1):58-64. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2013.05.004>
23. Ribeiro ES, Bisinotto RS, Lima FS, Greco LF, Morrison A, Kumar A, et al. Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *J Dairy Sci.* 2014; 97(11):6888-6900. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7908>
24. Souza AH, Carvalho PD, Rozner AE, Vieira LM, Hackbart KS, Bender RW, et al. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *J Dairy Sci.* 2015; 98(1):169-178. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8182>
25. Gamarra G, Ponsart C, Lacaze S, Le Guienne B, Humblot P, Deloche M-C, et al. Dietary propylene glycol and in vitro embryo production after ovum pick-up in heifers with different anti-Müllerian hormone profiles. *Reprod Fertil Dev.* 2015; 27(8):1249-1261. <https://doi.org/10.1071/RD14091>
26. Vernnuft A, Schwerhoff M, Viergutz T, Diederich M, Kuwer A. Anti-Müllerian hormone levels in plasma of Holstein-Friesian heifers as a predictive parameter for ovum pick-up and embryo production outcomes. *J Reprod Dev.* 2015; 61(1):74-79. <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-091>
27. Baruselli P, Batista E, Ferreira R. Niveles plasmáticos de hormona anti-mülleriana permite la selección de donadoras con alto potencial de producción de embriones. *SPERMOVA.* 2016; 1(6):1-13. <https://doi.org/10.18548/aspe/0003.01>

28. Guerreiro BM, Batista EOS, Vieira LM, Sá Filho MF, Rodrigues CA, Castro Netto A, et al. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domest Anim Endocrinol*. 2014; 49:96–104. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2014.07.002>
29. Batista, Vieira LM, Sá Filho MF, Dias EAR, Bayeux BM, Accorsi MF, et al. Ovarian follicular growth suppression by long-term treatment with a GnRH agonist and impact on small follicle number, oocyte yield, and in vitro embryo production in Zebu beef cows. *Theriogenology*. 2016; 85(9):1680–1687. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.023>
30. Batista EOS, Vieira LM, Freitas BG, Guerreiro BM, Carvalho JGS, Mingoti RD, et al. Anti-Mullerian hormone and its relationship to ovulation response and fertility in timed AI *Bos indicus* heifers. *Reprod Domest Anim*. 2020; 55(6):753–758. <https://doi.org/10.1111/rda.13677>
31. Sanders JO. History and Development of Zebu Cattle in the United States. *J Anim Sci*. 1980; 50(6):1188–1200. <https://doi.org/10.2527/jas1980.5061188x>
32. Jiménez A, Manrique C, Martínez C. Parámetros y valores genéticos para características de composición corporal, área de ojo del lomo y grasa dorsal medidos mediante ultrasonido en la raza. *Rev la Fac Med Vet y Zootec*. 2010; 57(3):178–190. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/view/18236/19143>
33. Ireland J, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen A, Ward F, Lonergan P, et al. Antral Follicle Count Reliably Predicts Number of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle¹. *Biol Reprod*. 2008; 79(6):1219–1225. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071670>
34. Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Carter F, Lonergan P, et al. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2012; 95(5):2355–2361. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4325>
35. Arouche N, Picard J-Y, Monniaux D, Jamin SP, Vigier B, Josso N, et al. The BOC ELISA, a ruminant-specific AMH immunoassay, improves the determination of plasma AMH concentration and its correlation with embryo production in cattle. *Theriogenology*. 2015; 84(8):1397–1404. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.026>
36. Maculan R, Pinto TLC, Moreira GM, Vasconcelos GL de, Sanches JA, Rosa RG, et al. Anti-Müllerian Hormone (AMH), antral follicle count (AFC), external morphometrics and fertility in Tabapuã cows. *Anim Reprod Sci*. 2018; 189(8):84–92. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.011>
37. Jimenez-Krassel F, Scheetz DM, Neuder LM, Ireland JLH, Pursley JR, Smith GW, et al. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. *J Dairy Sci*. 2015; 98(5):3036–3045. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8130>