

Relación entre la hormona Anti-mülleriana y la respuesta superovulatoria en vacas Holstein mestizas lecheras, criadas a pastoreo en el trópico alto latinoamericano

Relationship between Anti-müllerian hormone and superovulatory response in dairy crossbreed Holstein cows managed on grazing in the Latin American high tropics

Andrés Santiago Jácome-Aucay¹ , Juan José Zambrano-Villacis¹ , Luis Ayala-Guanga^{2*} 

¹Universidad Técnica de Manabí, Facultad de Ciencias Veterinarias. Portoviejo, Ecuador.

²Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Medicina Veterinaria. Cuenca, Ecuador.

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

RESUMEN

La superovulación (SOV) ha permitido multiplicar los animales de alto valor genético; sin embargo, la media de embriones transferibles obtenidos no ha mejorado en los últimos años. Uno de los factores que influye fuertemente es la variabilidad individual de la donadora respecto al número de folículos antrales presentes al momento del inicio del protocolo de SOV. Por lo tanto, en el estudio se determinó la relación y asociación existente entre la hormona Anti-mülleriana (AMH) y el recuento de folículos antrales (RFA) al inicio del protocolo de superovulación (T0), así como al momento de la primera inseminación (T9). Además, se evaluó el proceso de ovulación mediante el conteo de cuerpos lúteos (CL) presentes el día del lavado (CL16) y la cantidad de estructuras y embriones transferibles colectados (día 16) en 36 vacas Holstein mestizas lactantes, manejadas en explotaciones del trópico alto, en sistemas extensivos, alimentadas a pastoreo. Se determinó una concentración media de $0,07 \pm 0,03$ ng·mL⁻¹ de AMH, un RFA mayor a 4 mm promedio en día cero (T0) de $14,7 \pm 4,30$ folículos, con una relación y asociación entre estas variables baja ($r=0,21$; $R^2=0,04$; $P>0,05$); En contraposición, en día 9 (T9) el RFA fue de $16,4 \pm 5,2$ folículos y la relación y asociación alta y significativa con la AMH ($r=0,84$; $R^2=0,70$; $P<0,05$). Se estableció que el 22,2 % animales con alta AMH, presentaron 2,6 veces más hormona, 1,8 más folículos y proporcionaron 2,5 más embriones transferibles que las donadoras de baja AMH (47,2 %). En conclusión, las donadoras con un valor mayor a $0,09$ ng·mL⁻¹ de AMH permiten mejorar los resultados en biotécnicas reproductivas como MOET.

Palabras claves: Hormona Anti-Mülleriana; recuento de folículos antrales; superovulación; Holstein

ABSTRACT

Superovulation (SOV) has permitted to multiply animals of high genetic value; however, the average number of transferable embryos obtained has not improved in recent years. One of the factors that strongly influences is the individual variability of the donor with respect to the number of antral follicles present at the time of initiation of the SOV protocol. Therefore, the study determined the relationship and association between Anti-Müllerian hormone (AMH) and antral follicle count (RFA) at the beginning of the superovulation protocol (T0), as well as at the time of the first insemination (T9). In addition, the ovulation process was evaluated by counting the corpora lutea (CL) present on the day of washing (CL16) and the amount of structures and transferable embryos collected (day 16) in 36 lactating crossbreed Holstein cows, managed in farms from the high tropics, in extensive systems and fed to grazing. A mean concentration of 0.07 ± 0.03 ng·mL⁻¹ of AMH was determined, an average RFA greater than 4 mm on day 0 (T0) of 14.7 ± 4.30 follicles, with a low relationship and association between these variables ($r=0.21$; $R^2=0.04$; $P>0.05$). In contrast, on day 9 (T9) the RFA was 16.4 ± 5.2 follicles and the relationship and association high and significant with AMH ($r=0.84$; $R^2=0.70$; $P<0.05$). It was established that 22.2 % of the animals with high AMH presented 2.6 times more hormone, 1.8 more follicles and provided 2.5 more transferable embryos than the low AMH donors (47.2 %). In conclusion, donors with a value greater than 0.09 ng·mL⁻¹ of AMH allow to improve the results in reproductive biotechnologies such as MOET.

Key words: Anti-Müllerian hormone; antral follicle count; superovulation; Holstein

INTRODUCCIÓN

La multiovulación y transferencia de embriones (MOET) es una técnica de reproducción asistida en bovinos utilizada desde la década de 1970 [1]. En el año 2021 se llegó a producir alrededor de 386 mil embriones transferibles *in vivo* a nivel mundial [2]. Si bien esta biotecnología ha permitido aumentar el número de animales genéticamente superiores, no es menos cierto que en los últimos 40 años los resultados no han mejorado [3]. La baja respuesta en los protocolos de superovulación (SOV) está relacionada a factores inherentes al animal [4, 5], que han sido estudiados a profundidad como la raza [6], estado nutricional [7], momento del ciclo estral [8], paridad [9], edad [10], o aquellos factores externos como el tipo de hormona [4], dosis de hormonas [11], duración del tratamiento [12] y factores medioambientales [13]. Sin embargo, todos los conocimientos generados no han permitido mejorar los resultados en las proporciones esperadas.

Autores como Ireland y col. [14], mencionaron que un factor a profundizar es la alta variabilidad individual de las donadoras a los tratamientos de SOV, ya que la cantidad de folículos antrales disponibles al momento de iniciar los protocolos tienen efecto directo sobre la calidad y cantidad de embriones producidos. Por lo tanto, identificar hembras con alto recuento de folículos antrales (RFA) podría mejorar los resultados obtenidos hasta ahora en la SOV, ya que el RFA individual es repetible ($r=0,85$; [15]) y heredable ($0,31 \pm 0,14$) en un mismo animal [16].

En la actualidad la ecografía transrectal es la técnica utilizada para identificar y seleccionar donadoras con alto RFA [17, 18]. Sin embargo, esta técnica requiere personal capacitado, equipos costosos e instalaciones adecuadas [19], además, es necesario realizar varios escaneos ecográficos durante el ciclo estral de la donadora para determinar con exactitud el RFA [20].

Una alternativa que ha generado gran expectativa es la cuantificación de la hormona Anti-mülleriana (AMH). Esta es una glicoproteína de 140 kDa que pertenece a la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF β), producida por las células de la granulosa de folículos pequeños en crecimiento [21]. Se ha relacionado la concentración de esta hormona con el RFA; las vacas con altos RFA tienen concentraciones de AMH considerablemente mayores que las de bajo RFA [22]. Además, las vacas con bajo RFA tienen una respuesta superovulatoria pobre [23], menor concentración de P_4 y grosor del endometrio entre los días cero y seis del ciclo estral que las vacas con alto RFA [24]. Esta relación entre las concentraciones de AMH y el RFA se ha identificado tanto en vacas *Bos indicus* [25], como en *Bos taurus* criadas en el trópico bajo condiciones de producción intensiva [26]. Asimismo, en varios estudios se ha indicado que las concentraciones de AMH pueden utilizarse como biomarcador endócrino para predecir la respuesta ovulatoria en vacas de aptitud lechera [27], en vaquillas criadas en países de cuatro estaciones [28], en el trópico bajo en condiciones climáticas húmedas [15] y secas [29].

Sin embargo, hasta ahora no hay información disponible en ganado vacuno de genotipo Holstein mestizo, criadas en el trópico alto en sistemas extensivos, alimentadas al pastoreo. Considerando que el sistema de crianza, las características medioambientales propias de la zona geográfica y la adaptabilidad que han logrado los animales en este medio han generado cambios en algunos aspectos de la fisiología ovárica [30, 31, 32]. Por lo tanto, es importante indagar si la relación entre el RFA y la concentración de AMH descrita anteriormente en

otros genotipos y medioambientes también ocurre en vacas del trópico alto latinoamericano bajo condiciones de producción extensiva.

Con estos antecedentes el estudio buscó determinar la relación entre la concentración plasmática de AMH, y la respuesta superovulatoria en donadoras Holstein mestizas lactantes, alimentadas al pastoreo en explotaciones extensivas del trópico alto latinoamericano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y granja

La investigación se realizó en 15 ganaderías comerciales, ubicadas en el trópico alto del Ecuador, sobre los 2.500 metros sobre el nivel del mar, situadas en ecosistemas con temperaturas ambientales entre 7 a 18°C, humedad relativa 80 %, pluviosidad anual de 800 mm a 2.000 mm. Las ganaderías poseían un sistema de manejo extensivo controlado, alimentación con una mezcla de gramíneas (*Pennisetum clandestinum*), y leguminosas (*Lolium multiflorum*), (*Trifolium pratense*), (*Trifolium repens*), concentrado comercial y sales minerales.

Se seleccionaron 44 vacas de genotipo Holstein (*Bos taurus*) mestizo de carácter lechero (cruce entre Holstein y Criollo), peso promedio de $553,8 \pm 12,8$ kg, condición corporal (CC) de $3,2 \pm 0,05$, escala de 1-5, según lo descrito por Song y col. [33], edad media de $5,9 \pm 0,22$ años, multiparas ($3,1 \pm 0,18$ partos), producción láctea promedio de $19,1 \pm 0,80$ litros, cíclicas, sin problemas reproductivos, con un mínimo de 60 días de post parto. Se descartaron del experimento 8 donadoras por presentar problemas pódicos y mastitis subclínica. Durante la realización del estudio se tuvo presente 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 [34].

Diseño experimental

El experimento fue dividido en dos etapas, en la primera se determinó la relación y asociación entre la hormona AMH y el RFA, al inicio del protocolo de superovulación (T0), así como con el RFA observado previo a la primera inseminación (T9); además, se evaluó la ovulación mediante el conteo de cuerpos lúteos el día de la colecta (CL16), la cantidad de estructuras (ovocitos no fecundados, embriones viables, embriones degenerados o muertos), y embriones transferibles

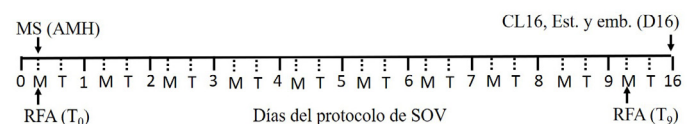


FIGURA 1. Protocolo de valoración de la concentración de hormona Anti-mülleriana, recuento de folículos antrales en los días 0 (T0), y día 9 (T9) del protocolo de SOV; así como la valoración de la cantidad de cuerpos lúteos (CL16), estructuras y embriones obtenidos el día del lavado (día 16) en vacas Holstein mestizas lecheras, criadas a pastoreo en el trópico alto latinoamericano. MS=toma de muestra de sangre. RFA (T0)=recuento de folículos antrales >4mm. RFA (T9)=recuento de folículos antrales >8mm el día de la primera IA. CL=recuento de cuerpos lúteos presentes el día de 16. EST= número total de estructuras colectadas (ovocitos no fecundados, embriones viables, embriones degenerados o muertos). EMB=número de embriones transferibles colectados. M=mañana y T= Tarde de los días del protocolo de superovulación (SOV)

recuperados (día 16). En esta parte del experimento se realizó la valoración de las 36 donadoras en conjunto (FIG. 1).

En una segunda etapa las 36 donadoras fueron agrupadas en animales con alta (G1: n=8), media (G2: n=11) y baja (G3: n=17) concentración de AMH, para lo cual se siguió la metodología descrita por Rico y col. [27], en la que brevemente se indica que se debe realizar terciles para separar los grupos. Se analizó el efecto de esta clasificación (G1, G2 y G3) sobre el RFA en los días cero (T0) y nueve (T9), el número de cuerpos lúteos el día del lavado uterino (día 16 del protocolo SOV), y el número de estructuras y embriones obtenidos luego del mismo.

Determinación de la concentración plasmática de la Hormona Anti-mülleriana (AMH)

En la mañana del día cero (T0) se colectó una muestra de sangre en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Vacutainer®), mediante punción de la vena coccígea. Las muestras fueron colocadas en un termo transportador con gel refrigerante a 5°C y llevadas al laboratorio, donde fueron centrifugadas (Micro 200, Hettich, Alemania) a 3.000 g × 20 min. El plasma obtenido se retiró y almacenó en alícuotas en tubos eppendorf (Joanlab, Zhejiang, China) a -20°C (Congelador RI405CR, INDURAMA, Ecuador), hasta el posterior análisis de AMH.

La concentración plasmática de AMH fue determinada con el kit ELISA tipo sándwich, (kit DL-AMH-b, Develop®, China), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la prueba se basó en la intensidad del color mediante espectrofotometría (BioTek 800 TS, Agilent, Santa Clara-CA, USA) a una longitud de onda de 450 nm. De acuerdo al fabricante el kit tiene una sensibilidad inferior a 0,117 ng·mL⁻¹; los coeficientes de variación inter e intra ensayo fueron menos de 10 y menos de 12 %, respectivamente.

Recuento de folículos antrales (RFA)

Para determinar el número de folículos antrales (RFA), los ovarios fueron escaneados transectalmente por un mismo técnico, como lo describió Ayala y col. [32], con un ecógrafo (ProSound 2, Aloka, Tokyo, Japón) provisto de un transductor lineal de 7,5 MHz. Las evaluaciones ecográficas para determinar el RFA se realizaron el día cero (día desconocido del ciclo estral de las donadoras-T0), y el día nueve del protocolo (T9), día de evaluación de la respuesta SOV, inmediatamente antes de la inseminación artificial (FIG. 1).

Superovulación, colección y evaluación de embriones

Las vacas fueron superovuladas usando un protocolo estándar con 8 dosis decrecientes de FSH (FIG. 2). Brevemente, todas las donadoras recibieron el día 0 un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona DIV (CIDR®; 1,38 g de progesterona; Zoetis, Quito, Ecuador) + 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Gonadiol®; Zoetis, Quito, Ecuador), por vía intramuscular (IM), y 50 mg de progesterona inyectable (Progesterona®; ERMA, Quito, Ecuador). A partir del día 4 en la tarde las donadoras recibieron dosis decrecientes de FSH (Folltropin-V®, Vetoquinol, Québec, Canada) cada 12 horas de la forma siguiente: 60, 60, 40, 40, 30, 30, 20, 20 mg, tal como se indica en la FIGURA 2. El día 6 en la tarde y 7 en la mañana se aplicaron 25 mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse®, Zoetis, Lima, Perú). El día 8 se detectó el celo por observación directa y mediante parches indicadores de estro (EstroTECT™, Rockway Inc., Spring Valley, USA). En la mañana del día 9 se realizó una inseminación artificial (IA) y se inyectó una dosis de 0,25 mg de Gonadorelina (GnRH®, MSD, Nueva York, USA) y 12 h después se practicó la segunda IA.

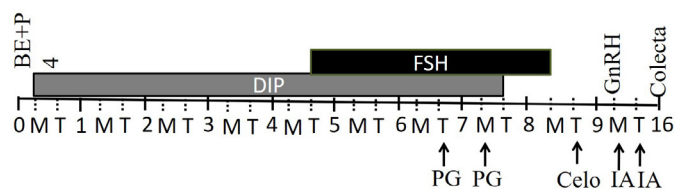


FIGURA 2. Protocolo de superovulación en vacas Holstein mestizas. BE=benzoato de estradiol. P4=Progesterona inyectable. DIV=dispositivo intravaginal de progesterona. FSH=hormona folículo estimulante. PG=prostaglandina. IA=inseminación. GnRH=gonadorelina. Colecta=colecta de embriones

Valoración del número de cuerpos lúteos (CL₁₆)

Para valorar la respuesta superovulatoria, se cuantificó el número de cuerpos lúteos presentes en los ovarios en el día 16, luego del lavado de las donadoras, mediante ultrasonografía como se describió en el RFA.

Colecta de embriones

Siete días después de la primera inseminación artificial, las donadoras fueron colocadas en una manga, teniendo presente las normas de bioseguridad tanto para el operador como para el animal. Se realizó asepsia del área vulvar y perineal. Para la insensibilización y tranquilización, se utilizó una mezcla de 4 mL de Clorhidrato de lidocaína al 2 %, (Lidocaine™, Richmond Vet Pharma, Buenos Aires, Argentina) y 0,4 mL de Xilacina al 2 % (Xilacina20, Richmond Vet Pharma, Buenos Aires, Argentina), vía epidural. Los embriones fueron colectados mediante técnica no quirúrgica, con un sistema de circuito abierto con flujo continuo (Tubo de 2 vías, Minitube USA, Verona, USA). Para el lavado se utilizó medio de lavado comercial (VIGRO™, Vetoquinol, Québec, Canada) y los embriones fueron colectados en un filtro EmCon de 75 µm, (Minitube USA, Verona, USA). El grado de desarrollo y calidad de los embriones fue determinada en base a los parámetros establecidos por la Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria [35].

Análisis Estadístico

Las variables continuas concentración de hormona Anti-mülleriana, número folículos en los días cero y nueve, tamaño de folículo ovulatorio, número de cuerpos lúteos en el día 16, tamaño del cuerpo lúteo, total de estructuras (ovocitos no fecundados, embriones transferibles, embriones degenerados o muertos) y número de embriones transferibles fueron procesadas para verificar si se ajustaban a los criterios de distribución normal y de homogeneidad. Las variables que no cumplieron estos criterios fueron transformadas a logaritmo 10. Los datos se analizaron con el procedimiento GLM de SAS; y las diferencias entre medias se compararon con el método de los mínimos cuadrados del SAS. Se consideró significativo un valor de $P < 0,05$. La relación y asociación entre la concentración de hormona Anti-mülleriana y el recuento de folículos antrales fueron analizadas mediante las pruebas de correlación de Pearson y regresión simple del programa estadístico Statical Analysis System (SAS) respectivamente [36].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis general de la concentración de la hormona Anti-mülleriana, recuento de folículos antrales, y relación y asociación entre las dos variables

La concentración media de la AMH ($n=36$) fue $0,07 \pm 0,03$ ng·mL⁻¹, con un valor mínimo de $0,03$ ng·mL⁻¹ y un máximo de $0,15$ ng·mL⁻¹ (TABLA I). Estos resultados presentaron alta variabilidad con respecto a los reportados previamente por Rico y col. [37] para la raza Holstein, en condiciones de manejo y medioambientales diferentes (vacas de 4-9 años de edad, en el trópico bajo). Estos autores describieron una concentración mínima de $0,025$ ng·mL⁻¹ (similar al presente estudio), sin embargo, el valor máximo ($0,228$ ng·mL⁻¹) fue 1,5 veces mayor que en el presente estudio.

TABLA I

Media y desviación estándar de la concentración plasmática de hormona Anti-mülleriana (AMH), del RFA realizado los días cero (T0) y 9 (T9) del protocolo de superovulación y del número total de cuerpos lúteos, estructuras y embriones transferibles colectados en el día 16 (T16)

Variable	$\mu \pm DE$ ($n=36$)	Valores		Correlación *	
		Mín	Máx	R	P
1. Hormona Anti-mülleriana (AMH)	$0,07 \pm 0,03$	0,03	0,15	—	—
2. Recuento de folículos antrales T ₀	$14,7 \pm 4,3$	8,00	26,0	0,21	0,23
3. Recuento de folículos antrales T ₉	$16,4 \pm 5,2$	7,00	27,0	0,84	0,01
4. Recuento de CL ₁₆	$10,8 \pm 3,6$	5,00	18,0	0,73	0,01
5. Estructuras colectadas ₁₆	$7,5 \pm 3,2$	0,00	14,0	0,76	0,01
6. Embriones transferibles ₁₆	$4,2 \pm 2,8$	0,00	11,0	0,78	0,01

Los datos se expresan como valores medios \pm desviación estándar (D.E). *: correlación entre la concentración de AMH (1) con cada una de las otras variables (2-6)

Esta diferencia en el valor máximo de la AMH se acentúa aún más en el estudio realizado en vacas Holstein estabuladas en el trópico bajo, con un valor mínimo de $0,038$ (similar a los valores de este trabajo) y un máximo de $0,774$ ng·mL⁻¹, que representa 5,2 veces más que el obtenido en este estudio ($0,15$ ng·mL⁻¹) [38]. Por otra parte, el valor máximo de AMH para vacas de leche negras japonesas ($1,99$ ng·mL⁻¹) fue 13,3 veces más alta [39] que en esta investigación. Además, fue 2,6 veces mayor que lo reportado por Gobikrushan y col. [38] y 8,7 veces más alta que lo descrito por Rico y col. [37], sin embargo, el valor mínimo de AMH ($0,032$ ng·mL⁻¹) fue semejante a los resultados obtenidos en los tres estudios anteriormente citados.

La variabilidad en los valores de AMH está probablemente relacionada con la utilización de diferentes métodos analíticos. Así, Rico y col. [37], utilizaron el kit DSL (Cergy-Pontoise, Francia) testado para líquido folicular bovino. Hirayama y col. [39] utilizaron el kit Gen II Elisa (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) y Gobikrushan y col. [38], el kit Ansh Labs Bovine AMH Elisa (Webster, TX, USA). Si bien todos los kits indicados fueron previamente testados para su uso en bovinos, la evidencia demuestra que los análisis con distintos kits pueden dar lugar a resultados diferentes. En un estudio se demostró que si bien los resultados pueden estar altamente correlacionados linealmente entre sí ($r=0,84$; $P<0,0001$), los valores medios de AMH obtenidos con un kit pueden llegar a ser 4,6 veces menores según el kit utilizado [40].

Al realizar el recuento de folículos antrales (RFA) mayores a 4 mm el día de inicio del protocolo de superovulación (T0), se observó un valor mínimo de 8 y máximo de 26 folículos, con una media de $14,7 \pm 4,30$ folículos. De igual manera, al evaluar la respuesta al proceso de superovulación, mediante el RFA mayor a 8 mm el día 9 del protocolo (T9), se obtuvo una media de $16,4 \pm 5,2$ (rango 7-27 folículos).

Los resultados del RFA obtenidos los días cero y 9 en el presente trabajo están en concordancia con los valores establecidos para vacas de raza Holstein ($18,5 \pm 9,0$ folículos), alimentadas al pastoreo, en zonas altas de Irlanda [41], que son criadas en condiciones de alimentación y medioambientales similares a las de este trabajo.

Sin embargo, cuando se evaluó el genotipo Holstein, bajo sistemas de alimentación intensivo (ración totalmente mezclada), en el trópico bajo, se estableció una media de 26 ± 1 folículos [38], valor similar ($27,2 \pm 12,2$ folículos) al descrito por Furukawa y col. [42] en condiciones equivalentes. Los resultados de estas dos investigaciones presentaron en promedio 1,8 veces más folículos antrales que en el presente estudio. Un factor que puede haber influido en la presencia de menor número de folículos en este tipo de animales (Holstein mestizos) es el sistema de alimentación (pastoreo), caracterizado por un valor energético reducido de los pastos [30]. De hecho, estudios de epigenética (reprogramación) describen que terneras nacidas de madres con restricción nutricional (60 % del requerimiento nutricional, en los primeros 110 días de gestación) presentaron un RFA ($15,8 \pm 1,8$ folículos) y concentraciones de AMH menores que la descendencia de madres que consumieron el 120 % del requerimiento nutricional (RFA = $23,6 \pm 1,9$) [43]. También se ha descrito que una nutrición deficiente de las madres impacta negativamente sobre el RFA y los niveles de AMH en su descendencia [44].

Además, en un estudio realizado en ovinos criados a gran altitud, ven reducida su población folicular a consecuencia de un efecto adverso de hipoxia hipobárica sobre la función del eje hipotálamo-hipófisis-ovarios. Esto provoca problemas en la esteroidogénesis por disminución de la secreción de FSH y LH, lo cual a su vez influye en el número y crecimiento de los folículos disponibles [45]. Un efecto semejante se ha determinado también en la mujer [46]. Sin embargo, en la especie bovina no se ha encontrado información sobre el efecto específico de la hipoxia hipobárica sobre la fertilidad; no obstante, en estudios previos se describieron cambios en algunos aspectos de la fisiología ovárica del bovino Criollo en la sierra del Ecuador, incluyendo un menor número de folículos antrales, precisamente en una región semejante a la de este estudio [32] y que podrían estar relacionado al factor altura.

La relación entre la concentración de AMH y el RFA en el día de inicio del protocolo de SOV fue baja ($r=0,21$; $P>0,23$) y no significativa (TABLA I); además, se estableció una asociación lineal baja ($R^2=0,04$; $P>0,05$) y no significativa (FIG. 3A). Al contrario, al relacionar el recuento de folículos antrales >8 mm realizado el día 9 del protocolo, con la concentración de la AMH, se determinó una relación alta y significativa ($r=0,84$; $P<0,01$) y una asociación fuerte (FIG. 3B) entre estas dos variables ($R^2=0,70$; $P<0,05$).

Los resultados obtenidos en el día de la valoración de la respuesta SOV (día conocido del ciclo estral) permitieron corroborar la fuerte relación entre la AMH y el RFA previamente establecida en la raza Holstein por varios investigadores. Así [15, 31, 37], describieron correlaciones de $r=0,59$ ($P<0,001$); $r=0,66$; $P<0,001$ y $r=0,80$; $P<0,001$ respectivamente, en vacas estabuladas con alimentación controlada en el trópico bajo.

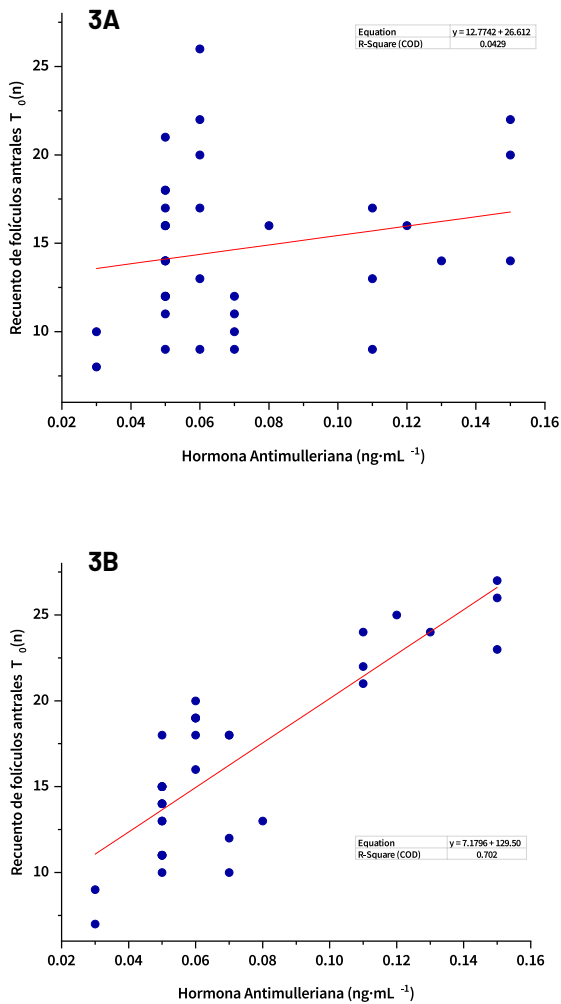


FIGURA 3. Asociación entre el nivel de hormona Anti-mülleriana y el recuento de folículos antrales en el día 0 (3A) y 9 (3B) del protocolo de superovulación.

En lo que respecta a la asociación lineal observada en el día cero del protocolo de SOV (día desconocido del ciclo estral), concuerda con los datos descritos por Gobikrushanth y col. [38] quienes determinaron una asociación lineal baja en un momento desconocido del ciclo estral ($R^2=0,29$).

Basado en el número de cuerpos lúteos en el día 16 y de folículos mayores a 8 mm en el día 9 del protocolo SOV se determinó una tasa de ovulación de 65,9 %, que tuvo una correlación positiva alta y significativa ($r=0,73$; $P<0,01$) con la AMH (TABLA I).

Al evaluar las estructuras colectadas se determinó una media de embriones transferibles de $4,2 \pm 2,8$ / lavado. Si bien este valor se encuentra por debajo de lo descrito a nivel internacional [47], cuyo valor promedio de 6,4 embriones transferibles/lavado. Es importante enfatizar que se hace referencia a promedios comerciales con donadoras seleccionadas minuciosamente, lo que no sucedió en el presente trabajo ya que por la naturaleza del estudio se superovularon vacas con alto y bajo RFA. Este argumento es corroborado por un estudio realizado, en el cual valoran la relación de la AMH y la respuesta a la SOV en vacas *Bos*

taurus(Simental) y obtuvieron un promedio de embriones transferibles de 3,21, valor inferior al obtenido en la presente investigación [48].

La correlación entre el número de estructuras obtenidas y la concentración de AMH fue alta ($r=0,78$; $P<0,01$) y considerablemente mayor a la descrita por Rico y col. [27], de $r=0,46$, $P<0,01$ para vacas Holstein. Asimismo, la prueba de regresión lineal entre las dos variables mostró un grado de asociación de $R^2=0,61$; $P<0,01$ (FIG. 4).

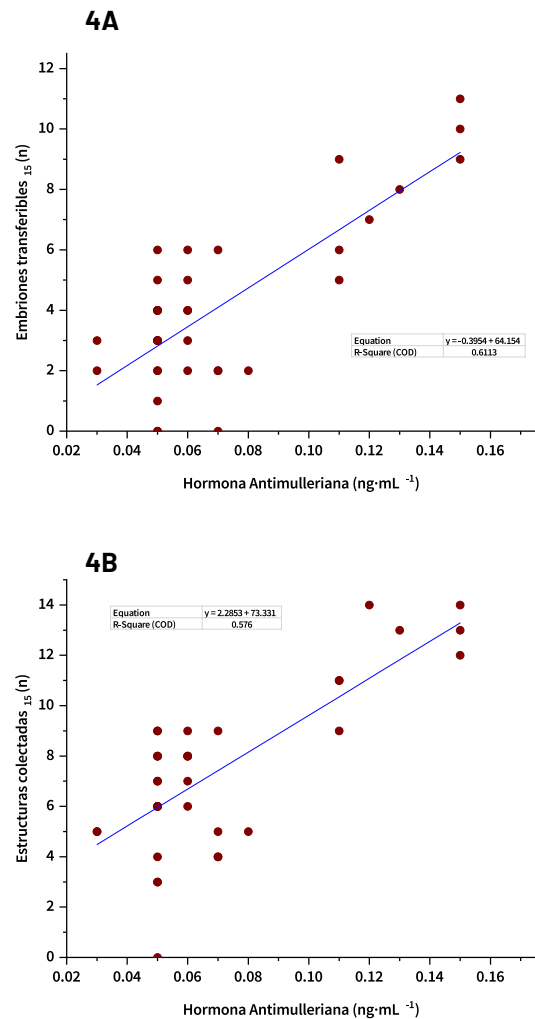


FIGURA 4. Asociación entre el nivel de hormona Anti-mülleriana y el número de embriones transferibles (4A) y de estructuras recuperadas (B) el día 16 del protocolo de superovulación

Resultados según los grupos de alta, intermedia y baja concentración de hormona Anti-mülleriana

Luego de categorizar las donadoras por la concentración de AMH, se estableció que el 22,2 % (n=8) fueron animales con altos niveles de AMH, el 30,6 % tuvieron concentración media (n=11) y el 47,2 % concentración baja (n=17). Las vacas con niveles altos de AMH ($0,13 \pm 0,02$ ng·mL⁻¹) presentaron una concentración de hormona 2,6 veces mayor que las vacas con baja AMH ($0,05 \pm 0,01$ ng·mL⁻¹; $P<0,05$; FIG. 5A).

Además, el número de folículos antrales observados a día 9 del protocolo de SOV, en el grupo de alta concentración de AMH fue casi el doble ($23,1 \pm 1,28$ folículos) con relación al grupo de bajo nivel de AMH ($13,1 \pm 0,76$ folículos; $P < 0,05$). Sin embargo, al inicio del protocolo (T0), el número promedio de folículos antrales en los tres grupos fue similar (bajo= $14,6 \pm 1,11$; medio= $15,2 \pm 1,22$; alto= $14,1 \pm 1,87$ folículos; $P > 0,05$; FIG. 5B).

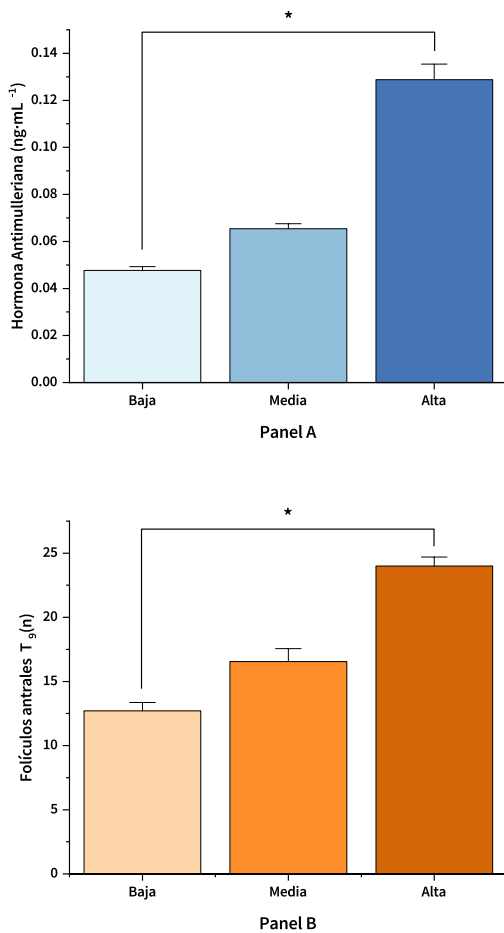


FIGURA 5. Panel A: Puntos de corte de la hormona Anti-mülleriana en el día 0 del protocolo de superovulación en donadoras Holstein mestizas. Grupo de baja (n=17) media (n=11) y alta (n=8) concentración de la hormona. Panel B: Recuento de folículos antrales en el día 9 del protocolo de superovulación. *: $P < 0,05$

El RFA en el grupo de menor concentración de AMH fue similar ($11,9 \pm 1,2$ folículos) en animales Holstein con similares características de paridad [22], aunque en el grupo de alta concentración describieron un 41,7% más de folículos antrales ($39,61 \pm 2,3$ folículos) que los observados en este estudio. Esta variabilidad también se observó en animales Holstein más jóvenes ($0,57 \pm 0,26$ ng·mL⁻¹ y $34,3 \pm 3,12$ folículos versus $0,06 \pm 0,02$ ng·mL⁻¹ y $13,4 \pm 1,40$ folículos en grupos de alta y baja AHM, respectivamente [15]. Es probable que el menor RFA y nivel de AHM observado en los animales del grupo de AMH alta pueda estar relacionado con el sistema de alimentación al pastoreo que predomina en las ganaderías ubicadas en la sierra alta ecuatoriana [49], sumado al efecto negativo que la hipoxia hipobárica presente en estas altitudes.

Respuesta al protocolo de superovulación en los grupos de alta, media y baja concentración de AMH

El porcentaje de ovulación en el grupo alta y baja AMH fue de 57,6 y 74,8 % respectivamente, valores semejantes (66,7 %) al de otros estudios en ganado Holstein [50]. Este porcentaje de ovulación se determinó en base al número de CLs observados mediante ecografía el día 16 del protocolo, llegando a establecer que el grupo de alta concentración de AMH presentó un 26,3 % más de cuerpos lúteos ($13,3 \pm 0,97$), en comparación con el grupo de baja AMH ($9,8 \pm 0,57$ CL; FIG. 6A). Este mayor porcentaje de ovulación en vacas con alta concentración de AMH, también fue descrita al valorar vacas Holstein en sistemas intensivos [26]; sin embargo, los valores medios difieren de los resultados reportados en esta investigación ($25,6 \pm 2,5$; Alta y $12,0 \pm 15$; baja AMH). En bovinos de carne los resultados descritos son similares con valores más altos de CLs en donadoras con alta AMH (17,6 CL) vs 8,5 CLs en vacas de baja AMH [23].

Al valorar el porcentaje de recuperación de estructuras se determinó que el grupo de alta concentración de AMH se recuperó un 84,2 % de estructuras, con una media de $11,2 \pm 0,77$ estructuras, vs un 67,3 % en el grupo de baja AMH (media $6,6 \pm 0,46$; FIG. 6B). Este resultado permite afirmar que superovular vacas con altos niveles

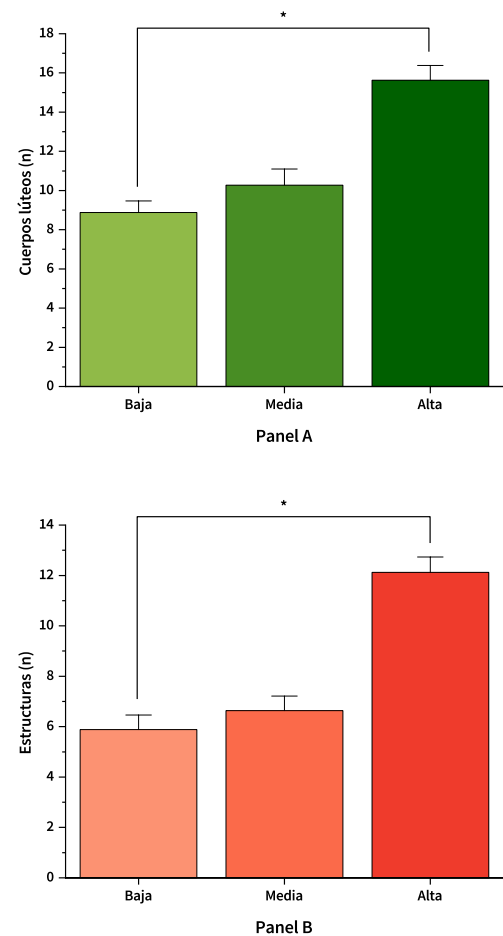


FIGURA 6. Número promedio de cuerpos lúteos (Panel A) y total de estructuras colectadas (Panel B), en donadoras Holstein mestizas de acuerdo al nivel de la hormona Anti-mülleriana (bajo, medio y alto). *: $P < 0,05$

de AMH permite recuperar 16,9 puntos porcentuales más estructuras que el grupo de baja AMH, datos similares fueron descritos para vacas Holstein ($14,0 \pm 2,35$; alta y $5,0 \pm 1,2$ estructuras; baja AMH; [51].

Finalmente, al evaluar el total de estructuras que fueron colectadas en cada grupo experimental, se estableció que en los de alta concentración de AMH un 73,2 % fueron embriones transferibles (promedio $8,2 \pm 0,77$ embriones/vaca; FIG. 7A); sin embargo, en el grupo de baja AMH se obtuvo 5 embriones transferibles menos (promedio $3,2 \pm 0,50$ embriones/vaca; FIG. 7A). Esta relación entre grupos de alta y baja AMH fue observada en otros estudios, quienes establecieron $3,1 \pm 0,8$ y $7,2 \pm 1,4$ embriones/vaca respectivamente [26], en la raza Holstein en condiciones de manejo diferentes, para ganado lechero con valores de $11,1 \pm 1,7$ (grupo de alta) y $4,4 \pm 0,9$ embriones transferibles (grupo de baja concentración de AMH) [29]. Por otro lado, el número de ovocitos no fecundados difirió entre los grupos de alta, media baja concentración de AMH en donadoras (FIG. 7B). Por lo tanto, superovular animales con alta concentración de AMH permite obtener 2,5 veces más embriones transferibles que el grupo de baja AMH.

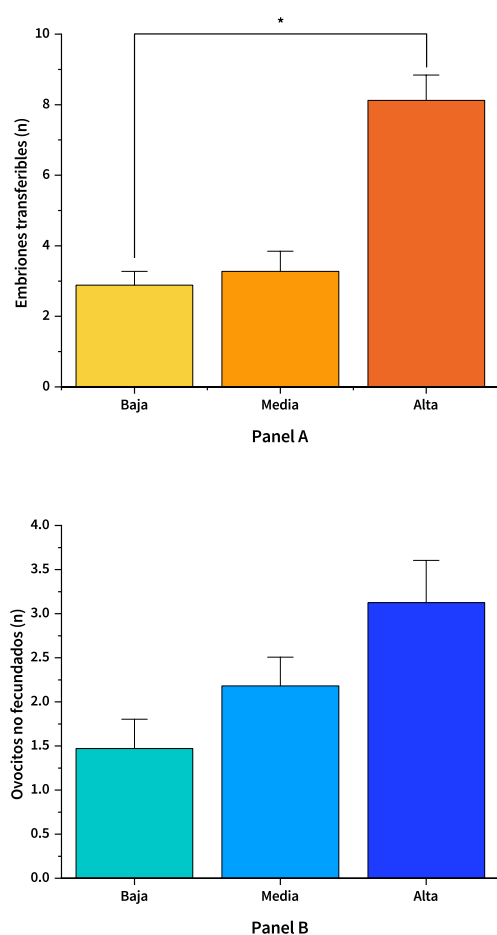


FIGURA 7. Media de embriones transferibles (Panel A) y ovocitos no fecundados colectados (Panel B), en donadoras Holstein mestizas de acuerdo al nivel de la hormona Anti-mülleriana (bajo, medio y alto)

CONCLUSIONES

Se estableció una concentración de AMH de $0,09 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ como valor referencial para la selección de vacas donadoras con alta población folicular. Este valor de corte permitió seleccionar el 22 % de las vacas incluidas en el estudio, que tuvieron 1,8 veces más folículos antrales y produjeron 2,5 veces más embriones transferibles que las de baja concentración de AMH. Se observó una correlación y asociación alta y significativa entre la concentración de AMH y el RFA; así como con el número de estructuras y embriones transferibles obtenidos. Esta estrategia de utilizar la concentración de AMH para seleccionar donadoras podría mejorar sustancialmente la producción de embriones *in vivo* en vacas Holstein mestizas en sistemas extensivos del trópico alto latinoamericano.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hasler JF. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenol.* [Internet]. 2014; 81(1): 152-169. doi: <https://doi.org/mfqs>
- [2] Viana HJ. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryol, Technol. Newsl.* [Internet]. 2022 [consultado 12 Dic. 2023]; 40(4):22-40. Disponible en: <https://goo.su/uq7sld>
- [3] Bó G, Mapletoft R. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenol.* [Internet]. 2014; 81(1):38-48. doi: <https://doi.org/gq4qc9>
- [4] Mikkola M, Taponen J. Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Folltropin or Pluset. *Theriogenol.* [Internet]. 2017; 88:84-88. doi: <https://doi.org/m6tc>
- [5] Silva JCC, Alvarez RH, Zanega CA, Pereira GT. Factors affecting embryo production in superovulated Nelore cattle. *Anim. Reprod.* [Internet]. 2009 [consultado 12 Dic. 2023]; 6(3):440-445. Available in: <https://goo.su/uUhb>
- [6] Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* [Internet]. 2002; 42(6): 601-611. doi: <https://doi.org/ftf593>
- [7] Mollo MR, Monteiro Jr. PLJ, Surjus RS, Martins AC, Ramos AF, Mourao GB, Carrijo LHD, Lopes Jr. G, Rumpf R, Wiltbank MC, Sartori R. Embryo production in heifers with low or high dry matter intake submitted to superovulation. *Theriogenol.* [Internet]. 2017; 92:30-35. doi: <https://doi.org/f9z927>
- [8] Rodrigues MCC, Bonotto ALM, Acosta DAV, Boligon AA, Corrêa MN, Brauner CC. Effect of oestrous synchrony between embryo donors and recipients, embryo quality and state on the pregnancy rate in beef cattle. *Reprod. Dom. Anim.* [Internet]. 2017; 53(1):152-156. doi: <https://doi.org/gcvwxw>
- [9] Lee WY, Song KY, Lim KT, Lee SJ, Lee BC, Jang G. Influence of factors during superovulation on embryo production in Korean Holstein cattle. *J. Vet. Med. Sci.* [Internet]. 2012; 74(2):167-174. doi: <https://doi.org/bd9p92>

- [10] Naranjo-Chacón F, Montiel-Palacios F, Canseco-Sedano R, Ahuja-Aguirre C. Embryo production in middle-aged and mature *Bos taurus* × *Bos indicus* cows induced to multiple ovulation in a tropical environment. *Trop. Anim. Health. Prod.* [Internet]. 2019; 51(8):2641-2644. doi: <https://doi.org/mbdh>
- [11] Chasombat J, Sakhong D, Nagai T, Parnpai R, Vongpralub T. Superstimulation of Follicular Growth in Thai Native Heifers by a Single Administration of Follicle Stimulating Hormone Dissolved in Polyvinylpyrrolidone. *J. Reprod. Dev.* [Internet]. 2013; 59(2):214-218. doi: <https://doi.org/f4tkc5>
- [12] Chankitisakul V, Pitchayapitakul J, Chuawongboon P, Rakwongrit D, Sakhong D, Boonkum W, Vongpralub T. Comparison of three superovulation protocols with or without GnRH treatment at the time of artificial insemination on ovarian response and embryo quality in Thai native heifers. *Trop. Anim. Health. Prod.* [Internet]. 2017; 49(3):633-639. doi: <https://doi.org/m6tf>
- [13] Snider AP, McLean D, Menino AR. Effects of feeding OmniGen-AF® on superovulatory response in donor beef cows: Serum progesterone and cortisol, embryo recovery and quality. *Anim. Reprod. Sci.* [Internet]. 2019; 210:106174. doi: <https://doi.org/gq3ttc>
- [14] Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JLH, Mossa F, Lonergan P, Evans ACO. 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.* [Internet]. 2011; 23(1):1-14. doi: <https://doi.org/cd2hf6>
- [15] Batista EOS, Macedo GG, Sala RV, Ortolan MDDV, Sá Filho MF, Del Valle TA, Jesus EF, Lopes RNVR, Rennó FP, Baruselli PS. Plasma antimüllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (nelore) and *Bos taurus* (holstein) heifers. *Reprod. Dom. Anim.* [Internet]. 2014; 49(3):448-452. doi: <https://doi.org/f54dgc>
- [16] Walsh SW, Mossa F, Butler ST, Berry DP, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Tempelman RJ, Carter F, Lonergan P, Evans ACO, Ireland JJ. Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. *J. Dairy Sci.* [Internet]. 2014; 97(7):4503-4511. doi: <https://doi.org/f57cmx>
- [17] Singh J, Domínguez M, Jaiswal R, Adams GP. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenol.* [Internet]. 2004; 62(1-2):227-243. doi: <https://doi.org/bz9cj7>
- [18] Patel DV, Chaudhari NN, Patil SR, Bhatol JG, Bhalodia SD, Devanand CP. Ultrasonographic elective superovulation and its response in crossbred and zebu cattle. *Indian J. Anim. Reprod.* [Internet]. 2013 [consultado 12 Dic. 2023]; 34(1):17-21. Disponible en: <https://goo.su/tvlv>
- [19] Perry GA, Cushman RA. Invited Review: Use of ultrasonography to make reproductive management decisions. *Prof. Anim. Sci.* [Internet]. 2016; 32(2):154-161. doi: <https://doi.org/m6tg>
- [20] Ginther OJ. The theory of follicle selection in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* [Internet]. 2016; 57:85-99. doi: <https://doi.org/f84prp>
- [21] Monniaux D, Rico C, Larroque H, Dalbiès-Tran R, Médigue C, Clément F, Fabre S. [Anti-Müllerian hormone, an endocrine predictor of the response to ovarian stimulation in the bovine species]. *Gynecol. Obstet. Fertil.* [Internet]. 2010; 38(7):465-470. French. doi: <https://doi.org/b7hg7g>
- [22] Ireland JLH, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen APN, Ward F, Lonergan P, Smith GW, Perez GI, Evans ACO, Ireland JJ. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol. Reprod.* [Internet]. 2008; 79(6):1219-1225. doi: <https://doi.org/cqdvzs>
- [23] Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO. 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.* [Internet]. 2007; 22(6):1687-1695. doi: <https://doi.org/d3hktr>
- [24] Jiménez C. Superovulación: Estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en bovinos. *Rev. Med. Vet. Zoot.* [Internet] 2009 [consultado 12 Dic. 2023]; 56(3):195-214. Disponible en: <https://goo.su/NoP0fs>
- [25] Silva-Santos KC, Santos GMG, Siloto LS, Santos JT, Oliveira ER, Machado FZ, Rosa CO, Seneda MM. The correlation between the number of antral follicles and ovarian reserves (preantral follicles) in purebred *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *Anim. Reprod. Sci.* [Internet] 2014; 151(3-4):119-125. doi: <https://doi.org/f6wm7k>
- [26] Souza AH, Carvalho PD, Rozner AE, Vieira LM, Hackbart KS, Bender RW, Dresch AR, Verstegen JP, Shaver RD, Wiltbank MC. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* [Internet]. 2015; 98(1):169-178. doi: <https://doi.org/f6sz7m>
- [27] Rico C, Drouilhet L, Salvetti P, Dalbiès-Tran R, Jarrier P, Touzé JL, 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.* [Internet]. 2012; 24(7):932-944. doi: <https://doi.org/f36zcg>
- [28] 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. *Domest. Anim. Endocrinol.* [Internet]. 2017; 60:19-24. doi: <https://doi.org/gbjz6x>
- [29] Abdel-Aziz RL, Khalil AAY, Abdel-Wahab A, Hassan NY, Abdel-Hamied E, Kasimanickam RK. Relationship among circulating anti-Müllerian hormone, insulin like growth factor 1, cadmium and superovulatory response in dairy cows. *Theriogenol.* [Internet]. 2017; 100:72-79. doi: <https://doi.org/m6tp>
- [30] Santos JEP, Cerri RLA, Sartori R. Nutritional management of the donor cow. *Theriogenol.* [Internet]. 2008; 69(1):88-97. doi: <https://doi.org/b6kwjh>
- [31] Baldrighi J, Sá Filho MF, Batista EOS, Lopes RNVR, Visintin JA, Baruselli PS, Assumpção MEOA. 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.* [Internet]. 2014; 49(6):1015-1020. doi: <https://doi.org/f6qtg2>

- [32] Ayala LE, Pesantez JL, Rodas ER, Dután JB, Calle GR, Murillo YA, Vázquez JM, Nieto PE, Ortega VV, Samaniego X. Dinámica folicular de vaquillas Criollas al pastoreo en el altiplano ecuatoriano. Arch. Zootec. [Internet]. 2019; 68(262):184–190. doi: <https://doi.org/mfrb>
- [33] Song X, Bokkers EAM, van Mourik S, Groot Koerkamp PWG, van der Tol PPJ. Automated body condition scoring of dairy cows using 3-dimensional feature extraction from multiple body regions. J. Dairy Sci. [Internet]. 2019; 102(5):4294–4308. doi: <https://doi.org/m6tg>
- [34] Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Código sanitario para los animales terrestres. 25 ed. Paris: OIE; 2016. Capítulo 7.8, Utilización de animales en investigación y educación; p. 449–461.
- [35] Stringfellow DA, Givens MD. Manual of the International Embryo Transfer Society: A Procedural Guide and General Information for the Use of Embryo Transfer Technology Emphasizing Sanitary Procedures. 4a. ed. Savory (Illinois, EUA): International Embryo Transfer Society; 2010. 170 p.
- [36] SAS Institute Inc. Base SAS® 9.4 Procedures Guide: Statistical Procedures. 2a. ed. Cary (North Caroline, EUA): SAS Institute Inc; 2013; 550 p.
- [37] Rico C, Fabre S, Médigue C, di Clemente N, Clément F, Bontoux M, Touzé JL, Dupont M, Briant E, Rémy B, Beckers JF, 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. [Internet]. 2009; 80(1):50–59. doi: <https://doi.org/chrw6j>
- [38] Gobikrushanth M, Dutra PA, Bruinjé TC, Colazo MG, Butler ST, Ambrose DJ. Repeatability of antral follicle counts and anti-Müllerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. Theriogenol. [Internet]. 2017; 92:90–94. doi: <https://doi.org/f9z9mz>
- [39] Hirayama H, Naito A, Fukuda S, Fujii T, Asada M, Inaba Y, Takedomi T, Kawamata M, Moriyasu S, Kageyama S. Long-term changes in plasma anti-Müllerian hormone concentration and the relationship with superovulatory response in Japanese Black cattle. J. Reprod. Dev. [Internet]. 2017; 63(1):95–100. doi: <https://doi.org/f9qqgg>
- [40] Fréour T, Mirallié S, Bach-Ngohou K, Denis M, Barrière P, Manson D. Measurement of serum Anti-Müllerian Hormone by Beckman Coulter ELISA and DSL ELISA: Comparison and relevance in Assisted Reproduction Technology (ART). Clinica Chimica Acta. [Internet]. 2007; 375(1–2): 162–164. doi: 10.1016/j.cca.2006.06.013
- [41] Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Lonergan P, Smith GW, Ireland JJ, Evans ACO. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. J. Dairy Sci. [Internet]. 2012; 95(5):2355–2361. doi: <https://doi.org/f3wztp>
- [42] Furukawa E, Masaki T, Sakaguchi K, Bo M, Yanagawa Y, Ueda K, Nagano M. Relationship between the timing of the first postpartum ovulation and antral follicle counts in Holstein cows. J. Ovarian Res. [Internet]. 2020; 13(7):1–9 doi: <https://doi.org/m6w3>
- [43] Mossa F, Carter F, Walsh SW, Kenny DA, Smith GW, Ireland J.L.H., Hildebrandt TB, Lonergan P, Ireland JJ, Evans ACO. Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. Biol. Reprod. [Internet]. 2013; 88(4):1–9. doi: <https://doi.org/gmq9x7>
- [44] Ribeiro ES, Bisinotto RS, Lima FS, Greco LF, Morrison A, Kumar A, Thatcher WW, Santos JEP. Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. J. Dairy Sci. [Internet]. 2014; 97(11):6888–6900. doi: <https://doi.org/f6kw26>
- [45] Parraguez VH, Gonzalez-Bulnes A. Endocrinology of reproductive function and pregnancy at high altitudes. Curr. Opin. Endocr. Metab. Res. [Internet]. 2020; 11:27–32. doi: <https://doi.org/m6w4>
- [46] Verratti V, Di Giulio C. High-altitude hypoxia and reproduction: Is there an environmental limit to the human male reproductive system? Sport. Sci. Health [Internet]. 2012; 7:39–40. doi: <https://doi.org/m6w5>
- [47] Viana MJH, Siqueira LGB, Palhão MP, Camargo SA. Use of *in vitro* Fertilization Technique in the Last Decade and its Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. Acta Sci. Vet. [Internet]. 2010 [consultado 05 Dic. 2023]; 38(Supl. 2): 661–674. Available in: <https://goo.su/VvTWm4R>
- [48] Sevgi R, Erdem H, Kardeşin T, Yılmaz MA, Satılmış M, Okuroğlu A, Ünal I, Dursun Ş, Alkan H, Satılmış F, Güler M. Determination of the relationship between serum anti-Müllerian hormone level and superovulatory response in Simmental cows. Reprod. Dom. Anim. [Internet]. 2019; 54(10):1322–1329. doi: <https://doi.org/m6w7>
- [49] Aguirre LR, Bermeo Ch A, Maza D, Merino LA. Estudio Fenotípico y Zoométrico del Bovino Criollo de la Sierra Media y Alta de la Región Sur del Ecuador (RSE). AICA. [Internet]. 2011 [consultado 05 Ene. 2024]; 1:392–396. Disponible en: <https://goo.su/Zzsq>
- [50] Betancourth J, Cáceres GG. Superovulación y transferencia de embriones en vacas lecheras utilizando dos protocolos hormonales [tesis de grado en Internet]. Zamorano (Honduras): Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano; 2011 [consultado 20 Dic. 2023]; 18 p. Disponible en: <https://goo.su/MdKnbc>
- [51] Souza AH, Carvalho PD, Rozner AE, Vieira LM, Hackbart KS, Bender RW, Dresch AR, Verstegen JP, Shaver RD, Wiltbank MC. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. J. Dairy Sci. [Internet]. 2015; 98(1):169–178. doi: <https://doi.org/f6sz7m>