



**RECuento DE FOLÍCULOS
ANTRALES Y CONCENTRACIONES
DE HORMONA ANTI-MÜLLERIANA:
DOS POTENCIALES
HERRAMIENTAS DE SELECCIÓN
DE REEMPLAZOS**

Marzo, 2019

SERIE
TÉCNICA

249

INIA

RECuento DE FOLÍCULOS ANTRALES Y CONCENTRACIONES DE HORMONA ANTI-MÜLLERIANA: DOS POTENCIALES HERRAMIENTAS DE SELECCIÓN DE REEMPLAZOS.

Antral follicle count and anti-Müllerian hormone concentrations: two potential replacement selection tools.

Editores: Editores: Carolina Viñoles Gil¹
Rodrigo Santa Cruz Torres²

¹ DMTV, MSc., PhD., Programa Nacional de Investigación Producción Carne y Lana, INIA Tacuarembó. Polo Agroforestal, UdelaR, EEER, km 408, Ruta 26, Cerro Largo.

² DCV, Pasante Programa Nacional de Investigación Producción Carne y Lana, INIA Tacuarembó. Polo Agroforestal, UdelaR, EEER, km 408, Ruta 26, Cerro Largo.

Título: Recuento de folículos antrales y concentraciones de hormona anti-Mülleriana: dos potenciales herramientas de selección de reemplazos.

Antral follicle count and anti-Müllerian hormone concentrations: two potential replacement selection tools.

Editores: Carolina Viñoles Gil, Rodrigo Santa Cruz Torres

Serie Técnica N° 249

ISBN: 978-9974-38-420-0

© 2019, INIA

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA
Andes 1365, Piso 12. Montevideo, Uruguay.
<http://www.inia.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Esta publicación no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

D.M.T.V., Ph.D. José Luis Repetto - Presidente

Ing. Agr., Mag. Mariana Hill - Vicepresidenta



Ing. Agr. Jaime Gomes de Freitas

Ing. Agr. Jorge Peñagaricano



Ing. Agr. Alberto Bozzo

Ing. Agr. Alejandro Henry



CONTENIDO

	Página
Índice de figuras	i
Índice de cuadros	iii
Resumen	iv
Abstract	iv
1. Introducción. Recría de vaquillonas: período determinante de su productividad futura.....	1
2. Recuento folicular y fertilidad. Relación entre el recuento máximo de folículos antrales, las concentraciones de hormona anti-Mülleriana y la concepción en vaquillonas Hereford.....	17
3. Reserva folicular y pubertad. El recuento de folículos antrales es una herramienta que permitiría seleccionar terneras más precoces al destete	19
4. Creep Feeding y recuento folicular. El Creep Feeding no afecta el recuento de folículos antrales al destete	37
5. Uso del recuento folicular a campo. Impacto del recuento de folículos antrales sobre la fertilidad de vaquillonas para carne.....	39
6. Programa recuento folicular automático. Detección de folículos en videos de ultrasonido de ovarios bovinos	43
7. Consideraciones finales.....	51

Índice de figuras

	Página
<i>Figura 1. Alimentación preferencial de los terneros (creep feeding), con acceso exclusivo a una ración de mayor calidad.....</i>	1
<i>Figura 2. Terneras en el período pos-destete pastoreando raigrás y recibiendo suplementación con granos de destilería secos con solubles (DDGS) en preparación para el entore de 13-15 meses.....</i>	2
<i>Figura 3. Actividad de celo en vaquillonas de 13-15 meses que alcanzan pesos > 300 kg pre-servicio.....</i>	3
<i>Figura 4. Evaluación del tracto reproductivo mediante ultrasonografía transrectal para realizar el monitoreo del entore.....</i>	4
<i>Figura 5. Esquema del desarrollo folicular que describe la foliculogénesis basal (pool de folículos (Fol.) de 1-5 mm) y la foliculogénesis final (Fol. > 5 mm).....</i>	6
<i>Figura 6. Evolución de la concentración sérica de progesterona durante el ciclo estral (Día 0= estro; Día 1= ovulación) en vacas de bajo y alto recuento de folículos antrales.....</i>	8
<i>Figura 7. Descripción del crecimiento de folículos primordiales, primarios y secundarios, bajo el control parácrino y de los folículos antrales pequeños, dominante y ovulatorio bajo el control endócrino, y los posibles sitios de acción de la hormona anti-Mülleriana (AMH).....</i>	9
<i>Figura 8. Metodología empleada para realizar el recuento de folículos antrales en terneras al destete, utilizando una sonda rígida de manipulación externa.....</i>	21
<i>Figura 9. Evolución del número de folículos de 2-5 mm y la concentración de hormona anti-Mülleriana (AMH) durante 5 días consecutivos en un sub-grupo de vaquillonas Hereford y Braford en las cuales pudo seguirse el crecimiento del folículo dominante.....</i>	25
<i>Figura 10. Regresión de la edad a la pubertad con el logaritmo del recuento máximo de folículos antrales (RMFA) pos-destete, en vaquillonas Braford.....</i>	26
<i>Figura 11. Regresión de la edad a la pubertad con el logaritmo de la concentración de hormona anti-Mülleriana (AMH) pos-destete, en vaquillonas Braford.....</i>	27
<i>Figura 12. Concentraciones de progesterona en el ciclo pos-inseminación artificial, en vaquillonas Braford del Año 2, con bajo, medio y alto recuento de folículos antrales.</i>	27
<i>Figura 13. Relación del logaritmo del recuento máximo de folículos antrales (RMFA) con el peso vivo, altura de anca y área de ojo de bife en vaquillonas Braford, Año 2, en la evaluación pos-destete.....</i>	28
<i>Figura 14. Fantoma con ovarios inmersos en gelatina y el escaneo con la sonda rígida.....</i>	45

<i>Figura 15. Regiones que se parecen a folículos son detectadas. Para imponer coherencia temporal, las detecciones son seguidas utilizando múltiples filtros de Kalman.....</i>	45
<i>Figura 16. Identificación del ovario como el cluster principal de tracks detectados.....</i>	46
<i>Figura 17. Resultados de las 50 repeticiones de validación cruzada en 6-folds para el conjunto derecha-a-izquierda</i>	47
<i>Figura 18. Diagrama con los diferentes factores que afectan el crecimiento y desarrollo de las vaquillonas, el recuento de folículos antrales (RFA) y la hormona anti-Mülleriana (AMH), como se relacionan y su potencial uso para seleccionar los reemplazos que tendrán mayor longevidad y productividad en el rodeo.</i>	52

Índice de cuadros

	Página
<i>Cuadro 1. Repetibilidad del recuento máximo de folículos antrales entre mediciones pos-destete y pre-servicio en dos años distintos usando vaquillonas Hereford y Braford.....</i>	24
<i>Cuadro 2. Repetibilidad de la concentración de hormona anti-Mülleriana (AMH) entre mediciones pos-destete y pre-servicio en dos años distintos usando vaquillonas Hereford y Braford.....</i>	24
<i>Cuadro 3. Correlación entre el recuento máximo de folículos antrales y la concentración de hormona anti-Mülleriana (AMH) incluyendo las mediciones pos-destete y pre-servicio en dos años diferentes usando vaquillonas Hereford y Braford.....</i>	25
<i>Cuadro 4. Recuento de folículos antrales (RFA), peso vivo (kg), altura (cm), área de ojo de bife (AOB, cm²) y espesor de grasa subcutánea (EGS, cm), momento de la concepción y preñez final de vaquillonas Angus, Hereford y cruza inseminadas a tiempo fijo en la primera (IATF1) o segunda (IATF2) oportunidad.....</i>	40
<i>Cuadro 5. Vaquillonas de la primera inseminación a tiempo fijo (n=271), clasificadas según el recuento de folículos antrales (RFA) en bajo, medio y alto, y su relación con el peso vivo (kg), altura de anca (cm), área de ojo de bife (AOB, cm²), espesor de grasa sub-cutánea (EGS, cm), condición corporal (CC, unidades) y momento de la concepción (días).....</i>	41
<i>Cuadro 6. Resultados alrededor del punto de funcionamiento calculado para los escaneos derecha a izquierda e izquierda a derecha.....</i>	48

Resumen

La correcta selección de reemplazos es la clave del éxito reproductivo, ya que el momento en que ocurre la primera preñez marca la productividad y longevidad de la vaca en rodeo de cría. Para ello, es fundamental utilizar variables fenotípicas que se expresen temprano en la vida del animal, y tengan moderada heredabilidad. El recuento de folículos antrales (RFA) y las concentraciones de hormona anti-Mülleriana (AMH), son potenciales herramientas de selección que cumplen ambos criterios. En esta serie técnica, se describe una secuencia de experimentos que permitieron poner a punto metodologías inexistentes en Uruguay, simplificar metodologías para su aplicación a campo y testar la hipótesis de que el RFA y la AMH pueden ser utilizadas para seleccionar vaquillonas al destete y pre-servicio con 14 y 24 meses de edad. Los resultados muestran que el RFA se relaciona con parámetros de crecimiento y desarrollo, y permitiría eliminar al destete vaquillonas Braford que alcanzan la pubertad más tarde. La alta correlación entre RFA y AMH sugiere que ambas herramientas podría utilizarse con el mismo objetivo. Las bajas concentraciones de progesterona en el ciclo pos-inseminación con 14 meses de edad en vaquillonas Braford con menor RFA, podría determinar una menor supervivencia embrionaria y preñez temprana. Vaquillonas Angus, Hereford y cruza con bajo RFA pre-servicio con 24 meses de edad, conciben más tarde que vaquillonas con mayor RFA. Se requiere de ajustes metodológicos y un mayor número de experimentos utilizando más animales, para validar la efectividad de éstas herramientas de selección de reemplazos.

Palabras claves: crecimiento, fertilidad, pubertad, ultrasonografía

Abstract

The correct selection of replacements is the key to reproductive success, since the moment in which the first pregnancy occurs marks the productivity and longevity of the cow in the breeding herd. For this, it is essential to use phenotypic variables that are expressed early in the animal's life, and have moderate heritability. The antral follicle count (AFC) and the concentrations of anti-Müllerian hormone (AMH) are potential selection tools that meet both criteria. In this technical series, we describe a sequence of experiments that allowed us to develop non-existent methodologies in Uruguay, simplify methodologies for their application in the field and test the hypothesis that the AFC and AMH can be used to select heifers at weaning and service with 14 and 24 months of age. The results show that AFC is related to parameters of growth and development, and would allow to eliminate at weaning Braford heifers that reach puberty later. The high correlation between AFC and AMH suggests that both tools could be used for the same purpose. The low concentrations of progesterone in the post-insemination cycle with 14 months of age in Braford heifers with lower AFC, could determine a lower embryo survival and early pregnancy. Heifers Angus, Hereford and crosses with low AFC pre-service with 24 months of age, conceive later than heifers with greater AFC. Methodological adjustments and a greater number of experiments using more animals are required to validate the effectiveness of these replacement selection tools.

Keywords: fertility, growth, puberty, ultrasonography

1. Introducción. Recría de vaquillonas: período determinante de su productividad futura

Carolina Viñoles^{1,3} y Rodrigo Santa Cruz^{2,3}

La recría de las vaquillonas, período que va desde el destete hasta su primer entore, es determinante en la productividad de la futura vaca en el rodeo de cría. Por éste motivo, la recría tiene objetivos de corto, mediano y largo plazo. El objetivo de corto plazo es entorar a la vaquillona con la menor edad posible, los objetivos de mediano plazo son lograr que un 70% se preñe en los primeros 21 días de servicio, obtener un alto porcentaje de preñez global en un servicio de corta duración (45-60 días), un primer parto sin dificultad y un alto porcentaje de preñez al segundo servicio, y el objetivo de largo plazo es que la vaca se mantenga productiva en el rodeo el mayor tiempo posible (longevidad).

El objetivo de corto plazo es altamente dependiente del genotipo y del ambiente (Schillo *et al.*, 1992). La recría es un período improductivo, durante el cual la ternera crece

y se desarrolla hasta alcanzar su madurez sexual (pubertad). Este período genera gastos, por lo tanto, cuanto más corto sea mayor será el retorno económico (Soares de Lima y Montossi, 2012). El peso de entore objetivo (e.g. 300-320 kg) va a depender del tamaño adulto de cada rodeo en particular. Lo importante es que la vaquillona logre un 55-60% del peso adulto, que es lo necesario para que alcance la pubertad (Freetly *et al.*, 2011). La duración de éste período depende del peso al destete, que a su vez depende del plano nutricional al que fueron sometidos el par vaca-ternera. Las estrategias como alta asignación de forraje y la suplementación preferencial de la ternera (creep feeding, Figura 1), permiten aumentar en 20-40 kg el peso al destete, y acelerar la recría de esas vaquillonas (Guggeri *et al.*, 2014; Viñoles *et al.*, 2013, 2012). Otro período clave es el post-destete, donde el plano nutricional determina

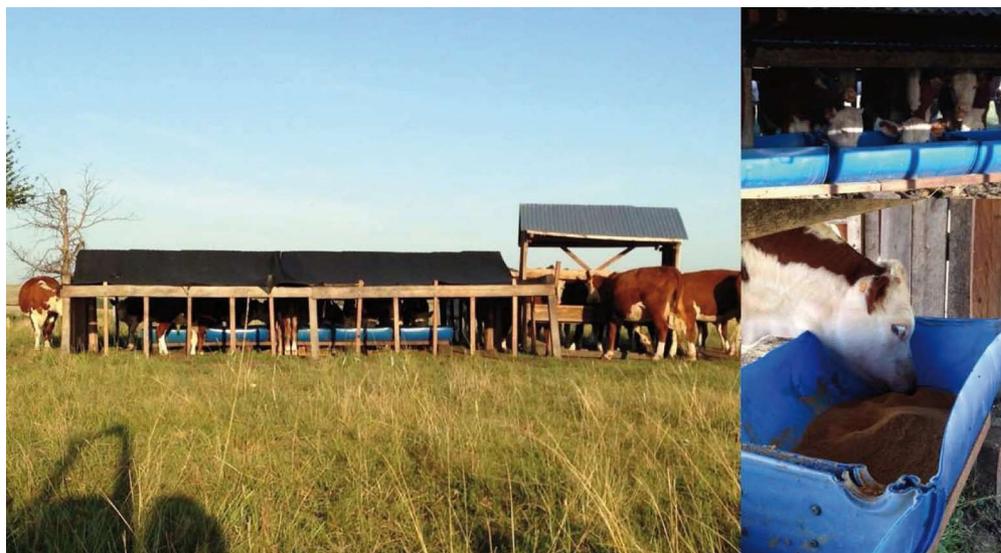


Figura 1. Alimentación preferencial de los terneros (creep feeding), con acceso exclusivo a una ración de mayor calidad (Atención R. Santa Cruz).

¹ DMTV, MSc., PhD., Programa Nacional de Investigación Producción Carne y Lana, INIA Tacuarembó

² DCV, Pasante INIA Tacuarembó, Programa Nacional de Investigación Producción Carne y Lana

³ Polo Agroforestal, UdelaR, EEER, km 408, Ruta 26, Cerro Largo

si las vaquillonas se entoran con 14, 18, 24 o 36 meses de edad (Figura 2)(Costa *et al.*, 2008; Schillo *et al.*, 1992). Este período es clave debido a que la base de la alimentación de las terneras es el campo natural, y su cantidad y calidad son inferiores en invierno y verano (dependiendo de la pluviosidad), por lo que los animales no cubren sus requerimientos de energía y proteína (Berretta *et al.*, 2000). Existe información nacional que confirma que la suplementación en el primer y segundo invierno de vida de las terneras, es clave para reducir la edad de entore de 36 a 24 meses (Quintans *et al.*, 1993). La suplementación invernal (100 días) con afrechillo de arroz, permite ganancias de peso leves (0,200 kg/d), y determina que se exprese el fenómeno de crecimiento compensatorio que se da en primavera, cuando la disponibilidad de forraje es mayor. Cuando se realiza un adecuado manejo del campo natural, con asignaciones de forraje de 6-8 cm en otoño, suplementación invernal y asignaciones de 8-10 cm en primavera, las terneras ganan 0,200 kg/d en otoño, 0,250 kg/d en invierno, y 0,700 kg/d en primavera, y alcanzan pesos de 300 kg en el segundo otoño de vida. Con una estrategia de éste tipo, se pueden permi-

tir leves pérdidas en el segundo invierno de vida, que se recuperarán en primavera, para lograr los pesos de entore objetivo, y un 80-85% de los kgs ganados se hacen en base al campo natural (Scarlato, 2014 com. pers.). La duración y el costo del período de recría, también depende del porcentaje de reemplazos que se realice anualmente al rodeo. Por éste motivo, es recomendable manejar un bajo porcentaje anual de reemplazos (12-14%), para seleccionar a las terneras cabeza de parición, que por tener mayores pesos al destete es menos costoso llevarlas al peso de entore (Bagley, 1993; Huges, 2013), particularmente si el mismo se realiza con 13-15 meses.

Dentro de los objetivos de mediano plazo, el de alcanzar un 70% de preñez en los primeros 21 días de un servicio corto y alto porcentaje de preñez global (>90%) se logra con vaquillonas que llegan ciclando regularmente al primer servicio (Figura 3), ya que cuantos más ciclos estrales hayan tenido mayor será la preñez (Byerley *et al.*, 1987; Snelling *et al.*, 2012; Wiltbank *et al.*, 1985). Vaquillonas más viejas y pesadas en adecuada condición corporal tienen mayor probabilidad de

2



Figura 2. Terneras en el período pos-destete pastoreando raigrás y recibiendo suplementación con granos de destilería secos con solubles (DDGS) en preparación para el entore de 13-15 meses (Atención W. Madeira).



Figura 3. Actividad de celo en vaquillonas de 13-15 meses que alcanzan pesos > 300 kg pre-servicio.

alcanzar la pubertad y concebir más temprano en su primer estación de servicios; por lo tanto, la edad, peso al destete y condición corporal son indicadores que permiten seleccionar vaquillonas que parirán más temprano (Engelken, 2008). Otros parámetros de crecimiento y desarrollo de las vaquillonas como la altura de anca y composición corporal, han sido utilizados con éxito por su alta asociación con el peso vivo (Guggeri *et al.*, 2014). A su vez, el uso de la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) es otra alternativa que nos permitiría alcanzar los objetivos de mediano plazo, ya que el 60% de las vaquillonas se preñan en el primer día de servicio (De Nava, 2011). Se ha postulado que el uso de hormonas puede adelantar la preñez en animales que naturalmente se preñarían más tarde, por lo que la selección de su progenie podría llevar a que el progreso genético por fertilidad sea más lento. Sin embargo, se ha descrito que la respuesta a la IATF en vaquillonas tiene una heredabilidad de 0,18 (Porto-Neto *et al.*, 2015), por lo que sería esperable que vaquillonas hijas de vacas que conciben a la IATF respondan también mejor que sus contemporáneas nacidas de monta natural (de Nava, comunicación personal).

El objetivo de tener un primer parto sin dificultad, se logra manejado correctamente

los componentes genéticos y ambientales (Hickson *et al.*, 2008). Para lograrlo se debe realizar una correcta selección de los toros, con tamaño adulto moderado, y datos objetivos de diferencia esperada de progenie para bajo peso al nacer y facilidad de parto, datos que además deben ser de alta exactitud (Viñoles, 2016), y contemplar la nutrición de la vaquillona. La nutrición tiene influencia en la ocurrencia de distocia producto de su impacto en el peso al nacimiento del ternero o en el tamaño de la vaquillona (desproporción materno-fetal) (Hickson *et al.*, 2006). Por tanto, otra ventaja adicional de tener una buena recría es que las vaquillonas lleguen con un buen desarrollo al parto, contribuyendo con el objetivo de un primer parto sin dificultad.

El objetivo de lograr una alta preñez al segundo servicio, se alcanza realizando una correcta asignación de forraje para lograr las condiciones corporales objetivo al parto. Esto es lograble si en el otoño (pos-destete en vacas con cría), aprovechando los bajos requerimientos del primer y segundo tercio de gestación, se pastorean potreros con altas asignaciones de forraje que permitan alcanzar condiciones de 5 en vacas y 6 en vaquillonas. Esto permite una pérdida controlada de condición en el invierno y por lo tanto llegar al parto con vacas en condición

4 y vaquillonas en condición 5, compatibles con porcentajes de preñez > 75% (Soca y Orcasberro, 1992). Adicionalmente, el uso combinado del creep feeding y destete temporario en vacas de primera cría, permite lograr que un 70% se preñen en los primeros 21 días de servicio, y aumentar así el porcentaje final de preñez (Bentancor *et al.*, 2013). Las estrategias nutricionales y de manejo del amamantamiento que pueden aplicarse para lograr altos porcentajes de preñez en el rodeo de cría, cuya base alimenticia es el campo natural, han sido revisadas anteriormente (Viñoles *et al.*, 2009). Dichas estrategias nutricionales y de manejo pueden verse complementadas por el uso de una tecnología que ha sido adoptada más recientemente, que es el diagnóstico de actividad ovárica o monitoreo del entore (Figura 4) (Quintans, 2016). Esta actividad

consiste en la realización de una revisión del tracto reproductivo mediante ultrasonografía transrectal al mes de comenzado el entore. En éste monitoreo se evalúa el tono uterino, presencia de embriones, y estructuras ováricas, para tomar decisiones en cuanto a estrategias a aplicar dependiendo de la situación de cada vaca. Se describen entonces 3 situaciones asociadas a diferentes estrategias de manejo: 1) vacas que están ciclando (presencia de cuerpo lúteo y potencialmente preñadas de menos de 28 días) o preñadas (embriones mayores a 28 días) no se les realiza ninguna manejo adicional; 2) vacas en anestro profundo (sin tono uterino y folículos menores a 8 mm) se les aplica destete precoz y 3) vacas en anestro superficial (tono uterino y estructuras > a 8 mm) se les aplica destete temporario con tablilla nasal (De Nava, 2011).



Figura 4. Evaluación del tracto reproductivo mediante ultrasonografía transrectal para realizar el monitoreo del entore. Las figuras A y B describen animales ciclando, y C y D vacas con diferente profundidad de anestro. Solamente las situaciones C y D requieren de la aplicación de medidas correctivas. A: presencia de embrión y cuerpo lúteo (vaca preñada); B: presencia del cuerpo lúteo (vaca ciclando, potencialmente preñada); C: presencia de folículo > 8 mm (anestro superficial); D: presencia de folículos < 8 mm y ausencia de tono uterino (anestro profundo)(Atención A. Betancort).

El objetivo de largo plazo, es mantener en el rodeo vacas longevas. La longevidad es una característica deseable, ya que se asocia con altos porcentajes de preñez, mayores pesos al destete y mayor retorno económico (Engelken, 2008; Perry y Cushman, 2013). Un rodeo de cría, que tiene un alto porcentaje (> 70%) de vacas de más de 2 partos y es manejado en forma adecuada, tiene elevados porcentajes de preñez, compatibles con la necesidad de un bajo porcentaje de reemplazos (Viñoles, 2016).

Las vaquillonas que se preñan en los primeros 21 días de entore, tienen una mayor longevidad en el rodeo de cría, y destetan terneros más pesados a lo largo de su vida productiva, ya que la característica de preñarse y parir temprano se repite a lo largo de los años (Perry y Cushman, 2013). Esto implica que tener vaquillonas que se preñan temprano, tiene un mayor retorno económico, desquitándose más rápidamente el costo de llevar a una vaquillona a su peso de entore, particularmente si el mismo se realiza con 13-15 meses (Viñoles, 2016). Por lo tanto, la selección de vaquillonas más fértiles antes de su primer entore, tendría un impacto muy alto en la eficiencia reproductiva global del rodeo de cría.

¿Cómo podemos seleccionar vaquillonas más fértiles?

La evaluación del grado de desarrollo del tracto reproductivo, a través del score de Anderson, es una herramienta que tiene una alta asociación con el porcentaje de preñez, peso al destete de los terneros, fertilidad al segundo entore y días al parto (Anderson *et al.*, 1991; Holm *et al.*, 2009). Más recientemente, se ha sugerido que el recuento de folículos antrales (RFA) y las concentraciones de una hormona asociada, la anti-Mülleriana (AMH), pueden ser potenciales candidatos para la selección fenotípica por fertilidad (Ireland *et al.*, 2008). La ventaja del RFA como herramienta de selección es que se expresa temprano en la vida del animal (al nacimiento), se puede evaluar fácilmente en el animal

en diferentes momentos de su vida, es repetible a lo largo de la vida del animal, y tiene una heredabilidad moderada.

¿En qué consiste el recuento máximo de folículos antrales?

Antes del servicio, el examen del tracto reproductivo para determinar su grado de desarrollo y realizar el recuento folicular (Anderson *et al.*, 1991; Cushman *et al.*, 2008; Rosenkrans y Hardin, 2003) pueden proveer un medio fenotípico para determinar la potencial fertilidad y eliminar vaquillonas que es menos probable que queden preñadas y se mantengan productivas y generando ingresos. El examen se realiza mediante palpación y ultrasonografía transrectal, evaluando el tamaño y tono uterino, las estructuras ováricas y contando todos los folículos antrales ≥ 2 mm en ambos ovarios, dado que son un indicador indirecto de la reserva folicular (Cushman *et al.*, 2009).

¿Qué es la reserva folicular?

Es el pool de folículos primordiales con que nacen las hembras y los óvulos que ellos contienen son los que gastarán a lo largo de su vida reproductiva (Fortune *et al.*, 2010; Garverick *et al.*, 2010; Scaramuzzi *et al.*, 2011). Por lo tanto, la reserva folicular determina la longevidad reproductiva potencial de cada hembra. El problema es que para contar directamente el número de folículos primordiales que tiene una hembra, habría que obtener los ovarios, ya que por su tamaño la evaluación solo puede realizarse a través de cortes histológicos que son evaluados al microscopio. Sin embargo, éstos folículos ováricos se desarrollan y pasan por diferentes fases de crecimiento, dependientes de la acción local y sistémica de diferentes factores (e.g. primarios, secundarios), hasta llegar a la fase de folículos antrales (Monniaux *et al.*, 2014). Los folículos antrales pueden ser evaluados por ultrasonografía, y son un indicador indirecto de la reserva folicular (Ireland *et al.*, 2008).

¿Cómo se desarrollan los folículos antrales?

Los folículos antrales pequeños (1-5 mm), representan un pool de folículos sensibles a las gonadotropinas que permiten describir la foliculogénesis basal, ya que su número es relativamente estable a lo largo del ciclo estral (Rico *et al.*, 2011). La fase de crecimiento terminal de los folículos antrales (> 5 mm) ocurre en forma de ondas de crecimiento (Evans *et al.*, 1994; Rajakoski, 1960; Savio *et al.*, 1988; Sirois y Fortune, 1988). Cada onda folicular es precedida por un aumento en las concentraciones de la hormona folículo estimulante (FSH), que determina el reclutamiento o emergencia de la misma. De éste grupo de folículos solamente se seleccionan 2 o 3 para continuar su crecimiento, pero generalmente solo uno se transforma en dominante y logra ovular (liberar el óvulo) si las condiciones son adecuadas (concentraciones de progesterona < 1 ng/ml, aumento en la frecuencia de pulsos de LH y producción de estradiol para que ocurra la manifestación estral; Figura 5) (Adams *et al.*, 1992; Evans

et al., 1994). El patrón de crecimiento en ondas se repite en animales en diferentes estadios fisiológicos como terneras a partir de las 2 semanas de vida (Evans *et al.*, 1994), vacas gestantes (Ginther *et al.*, 1996, 1989) y vacas durante el período de anestro post-parto (Savio *et al.*, 1990).

Existe una correlación positiva entre el número de folículos primordiales y el número de folículos antrales (Cushman *et al.*, 1999). Los folículos antrales ≥ 2 mm pueden ser identificados de manera confiable por ultrasonografía, representan junto a los folículos de 3 mm el 90% de la población visible durante la evaluación (Cushman *et al.*, 2009; Ireland *et al.*, 2008) y pueden ser usados para predecir la reserva folicular ovárica *in vivo*. El recuento de folículos antrales (RFA) ≥ 2 mm, tiene la ventaja de que puede realizarse en cualquier momento del ciclo estral, ya que su número es relativamente estable durante el mismo (Martinez *et al.*, 2016). Si solamente se consideran en el conteo los folículos > 3 mm es necesaria la sincronización de los animales o el seguimiento por 7-10

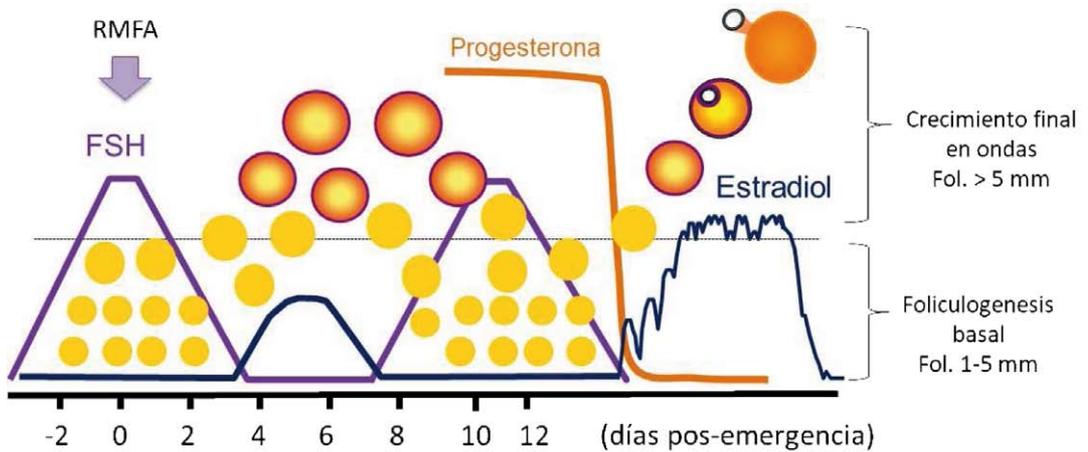


Figura 5. Esquema del desarrollo folicular que describe la foliculogénesis basal (pool de folículos (Fol.) de 1-5 mm) y la foliculogénesis final (Fol. > 5 mm) que ocurre en ondas, cuya emergencia es estimulada por un aumento en las concentraciones de hormona folículo estimulante (FSH). Un grupo de folículos (> 5 mm) es reclutado, pero unos pocos (2-3) continúan su crecimiento, ya que el folículo dominante produce estradiol, que reduce los niveles de FSH, e impide el crecimiento de los demás folículos del grupo. En animales ciclando, la reducción en los niveles de progesterona, permite el aumento en la frecuencia de pulsos de hormona luteinizante (no descrito en la figura), que estimula el desarrollo del folículo dominante, una alta producción de estradiol, la manifestación de celo y la ovulación. Los folículos de 1-5 mm (límite en la línea punteada), que son la mayoría de los folículos visibles por ultrasonografía (88%), son los productores de hormona anti-Mülleriana (AMH). El día de emergencia de la onda folicular corresponde al Día 0, cuando se espera el recuento máximo de folículos antrales (RMFA).

días para captar la emergencia de al menos una onda de desarrollo folicular (Burns *et al.*, 2005). Cuando se realiza el seguimiento de la onda de desarrollo folicular, se puede determinar el recuento máximo de folículos antrales (RMFA) que generalmente coincide con el día de la emergencia de la misma. La mayoría de los grupos de investigadores y veterinarios que utilizan ésta herramienta de selección a campo realizan una sola medida del RFA ≥ 2 mm en un día aleatorio del ciclo estral, ya que simplifica el manejo de los animales. Sin embargo, las diferencias metodológicas de la información publicada (inclusión de folículos de 2, 3 o > 5 mm en el recuento) han dado origen a resultados contrapuestos (Jimenez-Krassel *et al.*, 2017), por lo que la estandarización de la metodología es un aspecto que debe ser tenido en cuenta antes de utilizar ésta herramienta diagnóstica.

¿El recuento de folículos antrales se modifica con el tiempo?

La mayoría de los trabajos publicados sobre repetibilidad del RFA, se han realizado utilizando *Bos Taurus*, y particularmente ganado lechero (Holstein). El RFA es variable entre animales de la misma población (hasta 7 veces) pero altamente repetible en el mismo animal (0,85-0,95), durante las ondas de desarrollo folicular (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2008). Resultados similares fueron reportados en *Bos Indicus* (Nelore), observándose que el recuento de folículos antrales es mayor en el *Bos Indicus* (rango 18 a 85) respecto al *Taurus* (Holstein: rango 8-51), pero que la repetibilidad evaluada con un intervalo de 2 meses es alta (0,85) en ambas razas (Batista *et al.*, 2014). Sin embargo, la información sobre repetibilidad individual realizando mediciones más separadas en el tiempo, por ejemplo 6 meses, en animales pre-púberes *Bos Taurus* o *Indicus* (para carne y leche) es escasa. Además, los cambios nutricionales pre y posnatales pueden afectar la reserva folicular (Amundson *et al.*, 2015; Evans *et al.*, 2012; Mossa *et al.*, 2013), y reducir la repetibilidad si las mediciones se realizan antes y después de aplicar planos nutricionales diferenciales. Se ha sugerido

que el número de folículos antrales aumenta hasta los 5 años de edad, y luego disminuye (Cushman *et al.*, 2009), lo que podría estar asociado a la longevidad promedio de los animales de alta y baja cuenta folicular en el rodeo. En este sentido, el RFA es una característica de heredabilidad moderada, con estimaciones de $0,31 \pm 0,14$ y $0,25 \pm 0,13$ para vacas lecheras de Irlanda y EEUU; respectivamente (Walsh *et al.*, 2014). Estos trabajos sugieren que el RFA podría ser útil como herramienta de selección en el ganado vacuno para carne y leche.

¿Cuál es la relación del recuento de folículos antrales con la fertilidad?

El RFA está relacionado con parámetros reproductivos, en ganado para carne y para leche *Bos Taurus*. Vaquillonas para carne con bajo RFA tienen ovarios más chicos y menores tasas de preñez comparados con las de alto RFA (Cushman *et al.*, 2009). Una mayor proporción de vaquillonas con alto RFA se preñan en los primeros 21 días de servicio, comparadas con vaquillonas de bajo RFA (Cushman *et al.*, 2014). En vacas lecheras se encontró una asociación positiva entre RFA y performance reproductiva (Martinez *et al.*, 2016; Mossa *et al.*, 2012). La mayor calidad ovocitaria, mayor concentración de proteínas en el fluido uterino y las mayores concentraciones de progesterona (Figura 6) podrían explicar el mayor desarrollo del concepto y mayores porcentajes de preñez en vacas de alto respecto a bajo RFA (Jimenez-Krassel *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2016; McNeel *et al.*, 2017; Tessaro *et al.*, 2011). Por lo tanto, existe suficiente evidencia de que los mecanismos que determinan la calidad ovocitaria y viabilidad del embrión en sus primeras fases de desarrollo se ven favorecidos en vacas con alto respecto a bajo RFA. Sin embargo, trabajos más recientes sugieren que vacas con RFA muy alto, tiene menor fertilidad y una vida productiva más corta, comparado con vacas con RFA menores, probablemente asociado a situaciones metabólicas alteradas que inducen al síndrome de ovarios poliquísticos (Jimenez-Krassel *et al.*, 2017). Las inconsistencias encontradas pueden estar

asociadas a diferencias en la metodología utilizada para realizar el conteo de folículos antrales (ciclo sincronizado vs no sincronizado, conteo de folículos ≥ 2 o ≥ 5 mm, edad de los animales evaluados en los diferentes experimentos, número de animales evaluados). Por lo tanto, se requieren más estudios para establecer de qué manera se relaciona el RFA con la fertilidad, y su utilidad como herramienta de selección.

AMH: otro potencial candidato para la selección fenotípica por fertilidad

La AMH es una glicoproteína de 140k Da perteneciente a la familia de los factores de crecimiento transformante beta (TGF β) producida únicamente en las gónadas (Cate *et al.*, 1986). En el ovario su secreción se limita a las células de la granulosa de folículos sanos y en crecimiento (La Marca y Volpe,

2006), continuando su producción hasta que alcanzan el tamaño y el estado de diferenciación en que son seleccionados para ejercer la dominancia. Antes y después de esos dos puntos regulatorios importantes, los folículos no secretan AMH. Por esto es que se sugiere que la AMH tiene un rol importante en la regulación del número de folículos en crecimiento y en la selección de los folículos para la ovulación (Visser y Themmen, 2004). La AMH parece estar relacionada con los mecanismos que inhiben la activación de los folículos primordiales para que comiencen su crecimiento (Durlinger *et al.*, 2001; Fortune *et al.*, 2010), así como la de inhibir la acción de la FSH en el reclutamiento de los folículos antrales (Reclutamiento II, Figura 7). Por lo tanto, la AMH parece regular el gasto de los folículos de la reserva ovárica, prolongando la vida reproductiva de los animales.

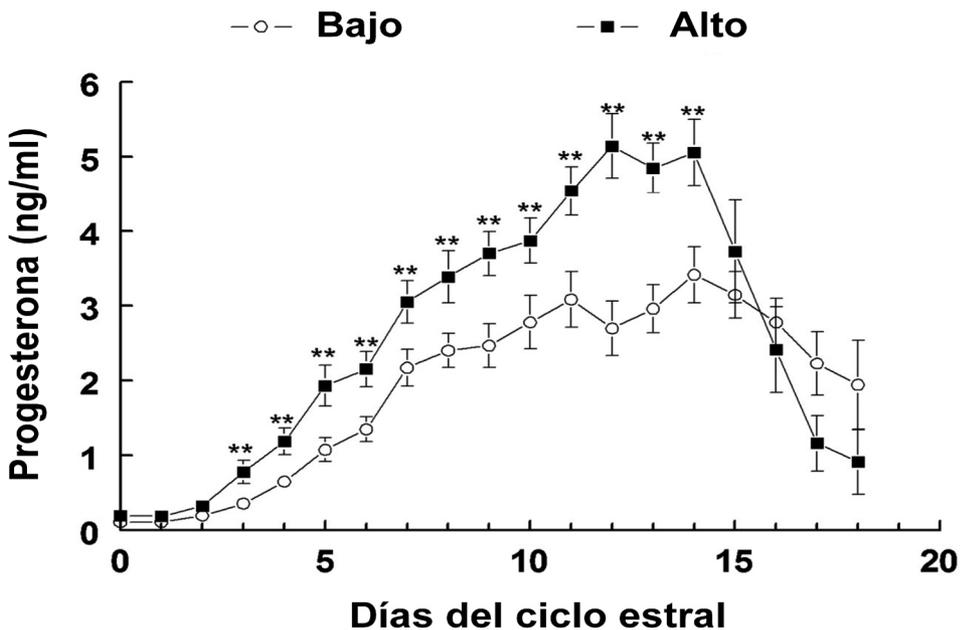


Figura 6. Evolución de la concentración sérica de progesterona durante el ciclo estral (Día 0= estro; Día 1= ovulación) en vacas de bajo (○) y alto (■) recuento de folículos antrales. Traducida de Jimenez-Krassel *et al.*, 2009.

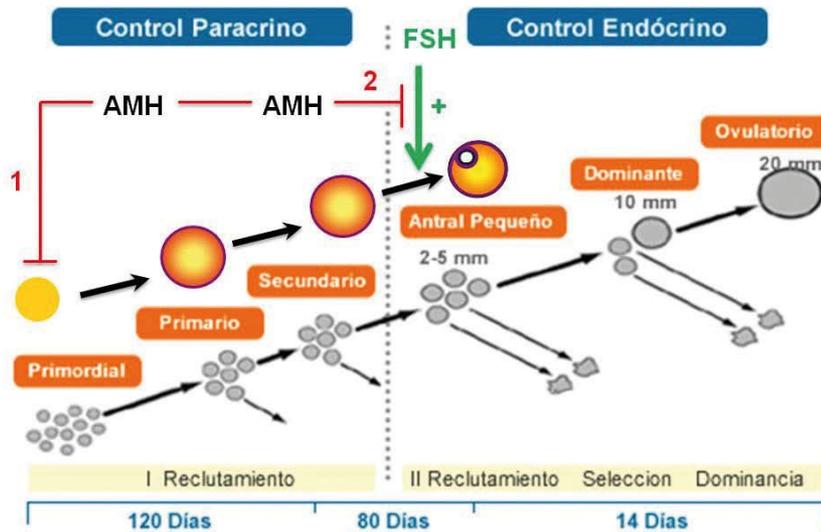


Figura 7. Descripción del crecimiento de folículos primordiales, primarios y secundarios, bajo el control paracrino y de los folículos antrales pequeños, dominante y ovulatorio bajo el control endócrino, y los posibles sitios de acción de la hormona anti-Mülleriana (AMH). La AMH actúa impidiendo que los folículos primordiales se activen (1) e inhibiendo la acción de la hormona folículo estimulante (FSH) en el reclutamiento folicular (2). Modificado de Fleming *et al.*, 2015; Visser *et al.*, 2006.

¿Cuál es la relación entre la AMH y el RFA?

Hay estudios que sugieren que en *Bos Taurus*, la AMH permitiría predecir la población de folículos saludables de 2 a 5 mm, que son el blanco principal de los tratamientos superovulatorios (Rico *et al.*, 2009, 2011). Estos hallazgos avalarían el uso de la concentración de AMH como un predictor de la respuesta del ovario a los tratamientos de superovulación en la vaca (Rico *et al.*, 2011). Animales con alta concentración de AMH tienen mayor respuesta folicular y ovulatoria al tratamiento, mientras que animales con baja AMH tuvieron pobre respuesta al tratamiento (Rico *et al.*, 2009). A su vez, reportes recientes observaron una asociación positiva entre AMH y fertilidad en vacas lecheras (Jimenez-Krassel *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2014). Ribeiro *et al.*, (2014) reportaron que vacas de baja concentración de AMH tuvieron menor tasa de preñez al primer servicio.

La concentración de AMH, al igual que el RFA, es altamente repetible en el mismo individuo (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2007, 2011). Existe una correlación positiva

($r=0,88$) entre la concentración de AMH y el RFA (Ireland *et al.*, 2011, 2008) y a su vez con el tamaño de la reserva ovárica ($r = 0,90$) en *Bos Taurus* para leche (Ireland *et al.*, 2008). En forma similar, Batista *et al.*, (2014), describen una alta correlación entre RFA y concentraciones de AMH en *Bos Indicus*.

La concentración de AMH es relativamente estable a lo largo del ciclo para cada animal, ocurriendo las mayores concentraciones alrededor del estro y después del Día 12 pos-ovulación (Batista *et al.*, 2014; Ireland *et al.*, 2008; Rico *et al.*, 2009; Rico *et al.*, 2011). Por lo que, una muestra tomada en un momento al azar del ciclo para medir AMH, puede ser considerado como un marcador fenotípico confiable. Inicialmente, se utilizaron kits de humanos para medir concentraciones de AMH en bovinos. El uso de éstos kits dio origen a algunas inexactitudes ya que en el humano las concentraciones de ésta hormona son mayores que en el bovino, los anticuerpos utilizados unen la hormona de los ruminantes con menor afinidad, y se desconoce la naturaleza del estándar usado en el kit de ELISA, lo que llevó a cuestionar la especificidad del mismo (Arouche *et al.*, 2015). Pos-

teriormente, se desarrollaron kits específicos para bovinos que permitieron levantar algunas de éstas limitantes y están disponibles en forma comercial para el análisis de ésta hormona en suero o plasma (Arouche *et al.*, 2015). Sin embargo, la estandarización de la metodología entre laboratorios referentes es clave para estimular su uso a nivel comercial.

¿Cómo se utiliza el dato de RFA y la concentración de AMH?

Los primeros trabajos de RFA utilizando *Bos Taurus* categorizaron a la población animal en baja (< 15 folículos), media (16 - 25) y alta cuenta folicular (> 25 folículos) (Ireland *et al.*, 2008), sugiriendo que las hembras de la categoría de bajo RFA podrían ser descartadas por menor fertilidad. Sin embargo, la gran variabilidad del RFA entre poblaciones de vaquillonas y la gran variación del criterio de clasificación en alto, medio o bajo RFA provoca que valores que son considerados como de bajo RFA por un autor puedan ser considerados en otra categoría por otro (Morotti *et al.*, 2015). Otra desventaja de usar categorías, es que algunos animales caen en la transición entre las mismas, y que 2 o 3 folículos de diferencia en el conteo, que está dentro del límite de error de la técnica, puede determinar que un animal de RFA media, sea clasificado como de baja y por lo tanto eliminado erróneamente del rodeo por su potencial menor fertilidad. Es por esto que se debe evitar categorizar a los animales utilizando puntos de corte rígidos, porque además se pierde el poder de la información individual continua que ofrece cada animal. La información individual permitiría eliminar solamente a los animales que tienen claramente un muy bajo o muy alto RFA, lo que sería deseable si los hallazgos de Jimenez-Krassel *et al.*, (2017) se confirmaran. El uso del RFA en ganado *Bos Indicus* es más limitado, en parte porque la abundancia de folículos antrales disminuye la exactitud de la evaluación por ultrasonografía. La información existente en cruza *Taurus-Indicus* es más limitada, pero algunos autores han encontrado una alta repetibilidad en la cuenta folicular realizada

al destete, lo que permitiría seleccionar los reemplazos a edades tempranas (Morotti *et al.*, 2017). El uso de puntos de corte en las concentraciones de AMH (74-87 pg/ml) para clasificar a los animales, ha tenido utilidad en la selección de hembras destinadas al uso de biotecnologías reproductivas, ya que la técnica permite discriminar a vacas que producen alta (>15) o baja (<10) cantidad de embriones *in vivo* antes de someterlas a los tratamientos de superovulación (Rico *et al.*, 2012). Este concepto es también aplicable al ganado *Bos Indicus*, ya que animales con mayor concentración de AMH tuvieron una mayor cantidad de folículos y se aspiraron mayor número de complejos cúmulo ovocitos, que resultaron en una mayor cantidad de embriones desarrollados *in vitro*, aunque el porcentaje de blastocitos fue similar entre vacas con alta y baja concentración de la hormona (Guerreiro *et al.*, 2014). Por lo tanto, ambas herramientas han probado ser útiles a nivel de campo. Una de las ventajas del uso del RFA respecto a la AMH en sistemas de producción extensivos, es que permite tomar decisiones al pie del animal, mientras la extracción de muestras para medir la AMH requiere de varios pasos intermedios antes de obtener el dato final (colectar la muestra, centrifugarla, acondicionarla, enviarla, que sea recibida en forma correcta y procesada en el laboratorio). El uso de los kits de AMH no ha sido ampliamente adoptado a nivel comercial, y existen aspectos metodológicos como la sensibilidad, repetibilidad y aspectos prácticos de colección y almacenamiento de las muestras que deben ser ajustados (tipo de anticoagulante, tiempo al procesamiento de la muestra, temperatura de conservación; (Arouche *et al.*, 2015; Rico *et al.*, 2012)). Otro aspecto a considerar al definir la herramienta para seleccionar los reemplazos, es el costo y la información brindada por cada una.

¿Es posible automatizar el conteo folicular?

La exactitud del conteo folicular depende del entrenamiento del operador y de la calidad de la imagen del ecógrafo (Viñoles *et al.*, 2004). Con algunos años de experiencia, se

puede realizar el conteo de 30 vaquillonas/hora (Viñoles, com. pers). Los programas automáticos de conteo folicular, podrían brindar una herramienta para mejorar la exactitud y velocidad de operadores con menor experiencia. Sin embargo, no existen hoy en el mercado programas de éste tipo, por lo que su desarrollo podría ser de gran utilidad para simplificar el uso de ésta herramienta de selección.

Referencias bibliográficas

- Adams, G.P., Matteri, R.L., Kastelic, J.P., Ko, J.C., Ginther, O.J.,** 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 94, 177–188. doi:10.1530/jrf.0.0940177.
- Amundson, O.L., Fountain, T.H., Larimore, E.L., Richardson, B.N., McNeel, A.K., Wright, E.C., Keisler, D.H., Cushman, R.A., Perry, G.A., Freetly, H.C.,** 2015. Post-weaning nutritional programming of ovarian development in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 93, 5232–5239. doi:10.2527/jas2015-9067.
- Anderson, K., LeFever, D., Brinks, J., Odder, K.,** 1991. The use of reproductive tract scoring in beef heifers. *Agri Pract.* 12, 19–26.
- Arouche, N., Picard, J.Y., Monniaux, D., Jamin, S.P., Vigier, B., Josso, N., Cate, R.L., di Clemente, N., Taieb, J.,** 2015. The BOC ELISA, a ruminant-specific AMH immunoassay, improves the determination of plasma AMH concentration and its correlation with embryo production in cattle. *Theriogenology* 84, 1397–1404. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.07.026
- Bagley, C.P.,** 1993. Nutritional management of replacement beef heifers: a review. *J Anim Sci* 71, 3155–3163.
- 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.,** 2014. Plasma antimüllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos Indicus* (nelore) and *Bos Taurus* (holstein) heifers. *Reprod. Domest. Anim.* 49, 448–452. doi:10.1111/rda.12304
- Bentancor, M., Bistolfi, A., Zerbino, L.,** 2013. Efecto del Creep Feeding y el Deste-te Temporario sobre el desarrollo de los terneros y la eficiencia reproductiva de vacas primíparas. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República.
- Berretta, E.J., Risso, D., Montossi, F., Pigurina, G.,** 2000. Campos in Uruguay, in: Lemaire, G., Hodgson, J., de Moraes, A., Nabinger, C., Carvalho, P.C. d F. (Eds.), *Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology.* CAB International, New York, USA, pp. 377–394.
- Burns, D., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J., Knight, P., Ireland, J.,** 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-Stimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.* 73, 54–62. doi:10.1095/biolreprod.104.036277
- Byerley, D.J., Staigmiller, R.B., Berardine-lli, J.G., Short, R.E.,** 1987. Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. *J. Anim. Sci.* 65, 645–650.
- Cate, R., Mattaliano, R., Hession, C., Tizard, R., Farber, N., Cheung, A., Ninfa, E., Frey, A., Gash, D., Chow, E., Fisher, R., Bertoni, J., Tones, G., Walker, B., Ramachandran, K., Ragin, R., Manganaro, T., YacLaughiin, D., Donahoet, P.,** 1986. Isolation of the Bovine and Human Genes for Müllerian Inhibiting Substance and Expression of the Human Gene in Animal Cells. *Cell* 45, 685–698.

- Costa, A., Moreira, R., Scarsi, A., Ayala, W., Quintans, G.,** 2008. Efecto de tres ganancias invernales sobre la aparición de la pubertad en terneras de raza carnicera (tercer año de evaluación), in: Quintans, G., Velazco, J.I., Roig, G. (Eds.), Serie Técnica No174. Seminario de Actualización Técnica: Cría Vacuna. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Treinta y tres, pp. 70–76.
- Cushman, R.A., Allan, M.F., Kuehn, L.A.,** 2008. Characterization of biological types of cattle: indicator traits of fertility in beef cows. *Rev. Bras. Zootec.* 37 (spe), 116–121.
- Cushman, R.A., Allan, M.F., Kuehn, L.A., Snelling, W.M., Cupp, A.S., Freetly, H.C.,** 2009. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *J. Anim. Sci.* 87, 1971–1980. doi:10.2527/jas.2008-1728
- Cushman, R.A., DeSouza, J.C., Hedgpeth, V.S., Britt, J.H.,** 1999. Superovulatory response of one ovary is related to the micro- and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the Cow. *Biol. Reprod.* 60, 349–54. doi:10.1095/biolreprod60.2.349
- Cushman, R.A., McNeel, A.K., Freetly, H.C.,** 2014. The impact of cow nutrient status during the second and third trimesters on age at puberty, antral follicle count, and fertility of daughters. *Livest. Sci.* 162, 252–258. doi:10.1016/j.livsci.2014.01.033
- De Nava, G.,** 2011. Reproducción en los rodeos de cría pastoriles: el enfoque de un veterinario de campo, in: XXXIX Jornadas Uruguayas de Buiatría. pp. 68–77.
- Durlinger, A., Grujters, M., Kramer, P., Karels, B., Kumar, T., Matzuk, M., Rose, U., de Jong, F., Uilenbroek, J., Grootegoed, J., Themmen, A.,** 2001. Anti-müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 142, 4891–4899.
- Engelken, T.J.,** 2008. Developing replacement beef heifers. *Theriogenology* 70, 569–572. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.05.032
- Evans, A., Adams, G., Rawlings, N.,** 1994. Follicular and hormonal development in pre-pubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J. Reprod. Fertil.* 102, 463–470. doi:10.1530/jrf.0.1020463
- Evans, A.C., O., Mossa, F., Walsh, S.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Ireland, J.J.,** 2012. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 31–37. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x
- Fleming, R., Seifer, D.B., Frattarelli, J.L., Ruman, J.,** 2015. Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. *Reprod. Biomed. Online* 31, 486–496. doi:10.1016/j.rbmo.2015.06.015.
- Fortune, M., Yang, M., Muruvi, W.,** 2010. The Eairlyst of Follicular Development: Follicle Formation and Activation. *Reprod. Domest. Ruminants VII.* 203–216.
- Freetly, H.C., Kuehn, L.A., Cundiff, L. V.,** 2011. Growth curves of crossbred cows sired by hereford, angus, belgian blue, brahman, boran, and tuli bulls, and the fraction of mature body weight and height at puberty. *J. Anim. Sci.* 89, 2373–2379. doi:10.2527/jas.2011-3847.
- Garverick, H., Juengel, J., Smith, P., Heath, D., Burkhart, M., Perry, G., Smith, M., McNatt, K.,** 2010. Development of the Ovary and Ontogeny of mRA Protein for P450 aromatase (arom) and Estrogen Receptors (ER) Alpha and Beta During Fetal Life in Cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 117, 24–33.
- Ginther, O., Kastelic, J., Knopf, L.,** 1989. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 20, 187–200.

- Ginther, O., Kot, K., Kulick, L., Martin, S., Wiltbank, M.**, 1996. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 108, 271–290.
- 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.**, 2014. Plasma anti-müllerian hormone: an endocrine marker for *in vitro* embryo production from *Bos Taurus* and *Bos Indicus* donors. *Domest. Anim. Endocrinol.* 49, 96–104. doi:10.1016/j.domaniend.2014.07.002.
- Guggeri, D., Meikle, A., Carriquiry, M., Montossi, F., De Barbieri, I., Viñoles, C.**, 2014. Effect of different management systems on growth, endocrine parameters and puberty in Hereford female calves grazing Campos grassland. *Livest. Sci.* 167, 455–462. doi:10.1016/j.livsci.2014.06.026.
- Hickson, R.E., Kenyon, P.R., Lopez-Villalobos, N., Morris, S.T.**, 2008. Effects of liveweight gain during pregnancy of 15-month-old angus heifers on dystocia and birth weight, body dimensions, estimated milk intake and weaning weight of the calves. *New Zeal. J. Agric. Res.* 51, 171–180. doi:10.1080/00288230809510445.
- Hickson, R.E., Morris, S.T., Kenyon, P.R., Lopez-Villalobos, N.**, 2006. Dystocia in beef heifers: A review of genetic and nutritional influences. *N. Z. Vet. J.* 54, 256–264. doi:10.1080/00480169.2006.36708.
- Holm, D.E., Thompson, P.N., Irons, P.C.**, 2009. The value of reproductive tract scoring as a predictor of fertility and production outcomes in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 87, 1934–1940. doi:10.2527/jas.2008-1579.
- Huges, H.**, 2013. Replacement heifer economic considerations. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 29, 643–652.
- Ireland, J., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G., Perez, G., Evans, A., Ireland, J.**, 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol. Reprod.* 79, 1219–1225. doi:10.1095/biolreprod.108.071670.
- Ireland, J., Smith, G., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J., Ireland, J., Mossa, F., Lonergan, P., Evans, A.**, 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in. *Reprod. Fertil. Dev.* 23, 1–14. doi:10.1071/RD10226.
- Ireland, J.J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C.O.**, 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum. Reprod.* 22, 1687–1695. doi:10.1093/humrep/dem071.
- Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Hou, X., Davis, J.S., Lonergan, P., Evans, A.C.O., Ireland, J.J.**, 2009. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *Biol. Reprod.* 80, 1272–1281. doi:10.1095/biolreprod.108.075093.
- Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D.M., Neuder, L.M., Ireland, J.L.H., Pursley, J.R., Smith, G.W., Tempelman, R.J., Ferris, T., Roudebush, W.E., Mossa, F., Lonergan, P., Evans, A.C.O., Ireland, J.J.**, 2015. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. *J. Dairy Sci.* 98, 3036–45. doi:10.3168/jds.2014-8130.

Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D.M., Neuder, L.M., Pursley, J.R., Ireland, J.J., 2017. A single ultrasound determination of ≥ 25 follicles ≥ 3 mm in diameter in dairy heifers is predictive of a reduced productive herd life. *J. Dairy Sci.* 100, 5019–5027. doi:10.3168/jds.2016-12277.

La Marca, A., Volpe, A., 2006. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin Endocrinol* 64, 603–610.

Martinez, M.F., Sanderson, N., Quirke, L.D., Lawrence, S.B., Juengel, J.L., 2016. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. *Theriogenology* 85, 466–475. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.09.026.

McNeel, A.K., Soares, É.M., Patterson, A.L., Vallet, J.L., Wright, E.C., Larimore, E.L., Amundson, O.L., Miles, J.R., Chase, C.C., Lents, C.A., Wood, J.R., Cupp, A.S., Perry, G.A., Cushman, R.A., 2017. Beef heifers with diminished numbers of antral follicles have decreased uterine protein concentrations. *Anim. Reprod. Sci.* 179, 1–9. doi:10.1016/j.anireprosci.2017.01.004.

Monniaux, D., Clément, F., Dalbiès-Tran, R., Estienne, A., Fabre, S., Mansanet, C., Monget, P., 2014. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? *Biol. Reprod.* 90, 85. doi:10.1095/biolreprod.113.117077.

Morotti, F., Barreiros, T.R.R., Machado, F.Z., González, S.M., Marinho, L.S.R., Seneda, M.M., 2015. Is the number of antral follicles an interesting selection criterion for fertility in cattle? 479–486.

Morotti, F., Santos, G.M.G., Júnior, C.K., Silva-Santos, K.C., Roso, V.M., Seneda, M.M., 2017. Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in beef heifers. *Theriogenology* 91, 21–26. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.12.025.

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., 2013. Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. *Biol. Reprod.* 8892, 1–9. doi:10.1095/biolreprod.112.107235.

Mossa, F., Walsh, S.W., Butler, S.T., Berry, D.P., Carter, F., Lonergan, P., Smith, G.W., Ireland, J.J., Evans, A.C.O., 2012. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 2355–61. doi:10.3168/jds.2011-4325.

Perry, G.A., Cushman, R., 2013. Effect of age at puberty/conception date on cow longevity. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 29, 579–590. doi:10.1016/j.cvfa.2013.07.011.

Porto-Neto, L.R., Edwards, S., Fortes, M.R.S., Lehnert, S.A., Reverter, A., McGowan, M., 2015. Genome-wide association for the outcome of fixed-time artificial insemination of Brahman heifers in northern Australia. *J. Anim. Sci.* 93, 5119–5127. doi:10.2527/jas.2015-9401.

Quintans, G., 2016. Diagnóstico de actividad ovárica: una herramienta que debemos conocer, in: *Revista INIA No 47.* pp. 13–14.

Quintans, G., Vaz Martins, D., Carriquiry, E., 1993. Efecto de la suplementación invernal sobre el comportamiento de ternera. *Jorn. Campo Nat.* 1993, Treinta y Tres, UY. *Campo Nat. Estrateg. invernal, manejo y Supl. Treinta y Tres INIA* 35–53.

- Rajakoski, E.**, 1960. Ovarian follicular system in sexually mature heifers with especial reference to seasonal, cyclical and left-right. *Acta Endocrinol.* 34, 1–68.
- Ribeiro, E.S., Bisinotto, R.S., Lima, F.S., Greco, L.F., Morrison, A., Kumar, A., Thatcher, W.W., Santos, J.E.P.**, 2014. Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility, *Journal of Dairy Science*. Elsevier. doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-7908.
- Rico, C., Drouilhet, L., Salvetti, P., Dalbis-Tran, R., Jarrier, P., Touz, J.L., Pillet, E., Ponsart, C., Fabre, S., Monniaux, D.**, 2012. 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.* 24, 932–944. doi:10.1071/RD11290.
- Rico, C., Fabre, S., Médigue, C., di Clemente, N., Clément, F., Bontoux, M., Touzé, J.-L., Dupont, M., Briant, E., Rémy, B., Beckers, J.-F., Monniaux, D.**, 2009. Anti-müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol. Reprod.* 80, 50–59. doi:10.1095/biolreprod.108.072157.
- Rico, C., Médigue, C., Fabre, S., Jarrier, P., Bontoux, M., Clément, F., Monniaux, D.**, 2011. Regulation of Anti-Müllerian Hormone Production in the Cow: A Multiscale Study at Endocrine, Ovarian, Follicular, and Granulosa Cell Levels¹. *Biol. Reprod.* 84, 560–571. doi:10.1095/biolreprod.110.088187.
- Rosenkrans, K.S., Hardin, D.K.**, 2003. Repeatability and accuracy of reproductive tract scoring to determine pubertal status in beef heifers. *Theriogenology* 59, 1087–1092.
- Savio, J., Boland, M., Roche, J.**, 1990. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. *Reprod. Fertil.* 88(2):581-591.
- Savio, J., Keenan, L., Boland, M., Roche, J.**, 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 83:663-671.
- Scaramuzzi, R., Baird, D., Campbell, B., Driancourt, M., Dupont, J., Fortune, J., Gilchrist, R., Martin, G., McNatty, K., McNeilly, A., Monget, P., Monniaux, D., Driancourt, M.-A., Viñoles, C., Weeb, R.**, 2011. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 23: 444–467.
- Schillo, K.K., Hall, J.B., Hileman, S.M.**, 1992. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *J Anim Sci* 70, 3994–4005.
- Sirois, J., Fortune, J.E.**, 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39:308–317.
- Snelling, W.M., Cushman, R.A., Fortes, M.R.S., Reverter, A., Bennett, G.L., Keele, J.W., Kuehn, L. a, McDaniel, T.G., Thallman, R.M., Thomas, M.G.**, 2012. Physiology and Endocrinology Symposium: How single nucleotide polymorphism chips will advance our knowledge of factors controlling puberty and aid in selecting replacement beef females. *J. Anim. Sci.* 90, 1152–65. doi:10.2527/jas.2011-4581.
- Soares de Lima, J., Montossi, F.**, 2012. La cría vacuna en la nueva realidad ganadera: análisis y propuestas de INIA. *Rev. INIA* 31, 6–10.
- Soca, P., Orcasberro, R.**, 1992. Propuesta de manejo del rodeo de cría en base a estado corporal, altura del pasto y aplicación de destete temporario. *Jorn. Prod. Anim. Paysandú Evaluación Física y Económica Altern. Tecnológicas para la cría en predios Ganad.* 54–56.

- Tessaro, I., Luciano, A.M., Franciosi, F., Lodde, V., Corbani, D., Modina, S.C.**, 2011. The endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide system is involved in the defective quality of bovine oocytes from low mid-antral follicle count ovaries. *J. Anim. Sci.* 89, 2389–2396. doi:10.2527/jas.2010-3714.
- Viñoles, C.**, 2016. Desafíos del entore de 14 meses. *Rev. INIA Uruguay* 6–9.
- Viñoles, C., Banchemo, G., Quintans, G., Pérez-Clariget, R., Soca, P., Ungerfeld, R., Bielli, A., Fernández Abella, D., Formoso, D., Pereira Machín, M., Meikle, A.**, 2009. Estado actual de la investigación vinculada a la Producción Animal Limpia, Verde y Ética en Uruguay. *Agrociencia* 13, 59–79.
- Viñoles, C., Giorello, D., Soares de Lima, J., Montossi, F.**, 2012. Alternativas para incrementar la eficiencia de los sistemas de cría. Suplementación exclusiva del ternero al pie de la madre (creep feeding). *Rev. INIA* 29, 5–8.
- Viñoles, C., Jaurena, M., De Barbieri, I., Do Carmo, M., Montossi, F.**, 2013. Effect of creep feeding and stocking rate on the productivity of beef cattle grazing grasslands. *New Zeal. J. Agric. Res.* 56, 279–287. doi:10.1080/00288233.2013.840320.
- Viñoles, C., Meikle, A., Forsberg, M.**, 2004. Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography in ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 80, 69–79. doi:10.1016/S0378-4320(03)00141-6.
- Visser, J.A., de Jong, F.H., Laven, J.S.E., Themmen, A.P.N.**, 2006. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 131, 1–9. doi:10.1530/rep.1.00529.
- Visser, J.A., Themmen, A.P.N.**, 2004. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis, in: *Molecular and Cellular Endocrinology*. pp. 81–86. doi:10.1016/j.mce.2004.09.008.
- Walsh, S.W., Mossa, F., Butler, S.T., Berry, D.P., Scheetz, D., Tempelman, R.J., Carter, F., Lonergan, P., Evans, A.C.O., Ireland, J.J.**, 2014. Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. *J. Dairy Sci.* 97, 4503–4511. doi:10.3168/jds.2013-7758.
- Wiltbank, J.N., Roberts, S., Nix, J., Rowden, L.**, 1985. Reproductive performance and profitability of heifers fed to weigh 272 or 318 kg at the start of the first breeding season. *J. Anim. Sci.* 60, 25–34.

2. Recuento folicular y fertilidad. Relación entre el recuento máximo de folículos antrales, las concentraciones de hormona anti-Mülleriana y la concepción en vaquillonas Hereford

Milena Sequeira^{1,3}, Serrana Guillen², Ana Meikle³, Carolina Viñoles⁴

Agradecemos a Marcelo Alt de Ansh Labs por la donación del kit de AMH.

Trabajo presentado en forma oral en el 2^{do} Congreso de la Sociedad Argentina de Tecnologías Embrionarias (SATE), Buenos Aires, 2014.

Introducción

El número de folículos antrales ováricos tiene una correlación positiva con las concentraciones de hormona anti-Mülleriana (AMH) y con la fertilidad en vaquillonas lecheras pos-púberes (Ireland *et al.*, 2008), pero su utilidad como herramienta para seleccionar animales al destete no se ha explorado. Los objetivos de este estudio fueron: 1) evaluar la relación entre el recuento máximo de folículos antrales (RMFA) y los niveles de AMH en terneras para carne pre y pos-púberes y 2) evaluar la asociación del RMFA con el momento de la concepción al primer servicio.

Materiales y métodos

Se utilizaron terneras Hereford pre-púberes (n = 56, año 2011), que fueron evaluadas a los $8,20 \pm 0,10$ meses de edad (20 días pos-destete) con $196 \pm 4,7$ kg de peso vivo y vaquillonas Hereford púberes (n = 40, año 2012) evaluadas 30 días pre-servicio, a los $12,7 \pm 0,3$ meses de edad con $342 \pm 4,7$ kg de peso vivo. Se evaluó el RMFA en ambos ovarios, registrándose en mapas el diámetro, número y posición de todos los folículos ≥ 2 mm durante 10 días en la observación pos-

destete (animales pre-púberes no sincronizados) y 5 días en la observación pre-servicio (animales púberes que fueron sincronizados con dos inyecciones de prostaglandina, con intervalo de 11 días. La evaluación comenzó a las 24 hs de administrada la segunda dosis de prostaglandina); con la intención de captar la emergencia de al menos una onda folicular. La ecografía ovárica se realizó utilizando un ecógrafo en tiempo real modo B (Aloka 500, Aloka Ltd., Tokyo, Japón) utilizando una sonda transrectal lineal de 7.5 MHz rígida, de manipulación externa en la terneras, y flexible, de manipulación interna en las vaquillonas. El día del RMFA fue definido como el día en que se observó el mayor número de folículos ≥ 2 mm de diámetro. Se extrajeron muestras de sangre de la vena yugular en forma diaria durante el seguimiento folicular. Las concentraciones de AMH se analizaron en el suero extraído el día de RMFA utilizando un kit específico para bovinos (Kit AL-114, Ansh Labs, Texas, EEUU). El kit fue validado en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, de la Facultad de Veterinaria. En las terneras pre-púberes, se determinaron 3 categorías de RFA: baja (< 15 folículos), media (16 - 35 folículos) y alta (> 35 folículos), y en las púberes se determinaron 2 categorías:

¹ LCB, MSc., INIA, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay

² DMTV, MSc., INIA, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay

³ DMTV, MSc., PhD., Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Uruguay

⁴ DMTV, MSc., PhD., INIA, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay. Polo Agroforestal, UdelaR, EEER, km 408, Ruta 26, Cerro Largo

media y alta, ya que no hubieron animales con recuento < 15 folículos en ésta población de animales. La relación RMFA - AMH se evaluó en tres hembras pre-púberes y cuatro púberes de cada categoría utilizando el Proc Mixed de SAS, incluyendo en el modelo la etapa reproductiva y la categoría de RMFA. Todos los animales (n = 96) fueron servidos con 13 - 15 meses de edad en el 2011 y 2012, y se estimó la fecha de concepción, restando 280 días a la fecha de parto. La correlación entre concepción - RMFA se evaluó con los datos individuales de cada animal y por separado según la etapa reproductiva, usando el Proc Corr de SAS. El nivel de significancia fue $P < 0,05$ y tendencia $P < 0,10$.

Resultados

La etapa reproductiva no afectó las concentraciones de AMH ($0,38 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$). Las terneras pre-púberes con bajo RMFA presentaron menor concentración de AMH ($0,06 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$) que las de medio ($0,52 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$) y alto ($0,71 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$; $p < 0,01$). Las vaquillonas púberes de alto RMFA presentaron una concentración de AMH mayor ($0,58 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$) que las de medio RMFA ($0,14 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$; $p < 0,01$). La relación RMFA-momento de la concepción, no alcanzó el nivel de significancia establecido ($p < 0,05$), pero si fue significativo para $p < 0,10$ en el caso de las terneras pre-púberes ($r = 0,26$; $p = 0,056$).

Conclusiones

Concluimos que existe una clara diferencia en las concentraciones de AMH entre animales de bajo, medio y alto RMFA, como ha sido demostrado en ganado lechero (Ireland *et al.*, 2008). Los resultados de este estudio sugieren que la selección al destete de las terneras con alto RMFA, podría ser un marcador fenotípico de eficiencia reproductiva, como ha sido sugerido por otros autores en corderas (Lahoz *et al.*, 2012). Se considera relevante profundizar este estudio con un mayor número de animales sometidos a altos planos nutricionales y determinar la repetibilidad del RMFA y AMH pos-destete y pre-servicio en las mismas hembras, y qué relación tienen la edad a la pubertad y momento de concepción con su desarrollo y composición corporal.

Referencias bibliográficas

- Ireland, J.L., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A.P., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G.W., Perez, G.I., Evans, A.C., Ireland, J.J., 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod* 79, 1219–1225. doi:biolreprod.108.071670 [pii] 10.1095/biolreprod.108.071670
- Lahoz, B., Alabart, J.L., Monniaux, D., Mermillod, P., Folch, J., 2012. Anti-Müllerian hormone plasma concentration in prepubertal ewe lambs as a predictor of their fertility at a young age. *BMC Vet. Res.* 8, 118. doi:10.1186/1746-6148-8-118

3. Reserva folicular y pubertad. El recuento de folículos antrales es una herramienta que permitiría seleccionar terneras más precoces al destete

Rodrigo Santa Cruz^{2,3}, Robert Cushman⁴, Carolina Viñoles^{1,3}

Trabajo publicado en la revista *Theriogenology*: Santa Cruz, R., Cushman, R.A., Vinales, C., 2018. Antral follicular count is a tool that may allow the selection of more precocious Bradford heifers at weaning. *Theriogenology* 119, 35–42. doi10.1016/j.theriogenology.2018.06.010

Introducción

La edad a la pubertad y primer parto afectan el desempeño reproductivo de la vaca de cría durante su vida productiva (Edwards *et al.*, 2015; Lesmeister *et al.*, 1973). Vaquillonas que se preñan en los primeros 21 días de servicio, permanecen durante más tiempo en el rodeo y destetan terneros más pesados respecto a las que se preñan más tarde (Perry y Cushman, 2013). La edad, peso vivo y condición corporal se asocian con una mayor probabilidad de alcanzar la pubertad y concebir más temprano (Engelken, 2008). Otros parámetros de crecimiento y desarrollo de las vaquillonas como la altura de anca y composición corporal, también han sido utilizados con éxito por su alta asociación con el peso vivo (Guggeri *et al.*, 2014). Sin embargo, la pubertad es un proceso complejo que envuelve una serie de eventos. La nutrición, la edad y la genética influyen en el desencadenamiento de la pubertad, principalmente como reguladores de la maduración del eje hipotalámico – hipofisario – gonadal, la cual debe ocurrir para la iniciación de los ciclos estrales normales (Perry, 2016). La complejidad del inicio de la pubertad explica que la selección de vaquillonas de reemplazo basado únicamente en el peso vivo puede no ser suficiente. Más recientemente, se ha descrito al recuento máximo de folículos antrales (RMFA) y las concentraciones de hormona anti-Mülleriana (AMH) pre-servicio como marcadores fenotípicos de fertilidad en

vaquillonas (Ireland *et al.*, 2008). Las vaquillonas que tienen mayor número de folículos antrales tienen mayores niveles de AMH y progesterona y se preñan más temprano que vaquillonas con menor número de folículos antrales (Jimenez-Krassel *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2016). En corderas se ha asociado un inicio más temprano de la pubertad con mayores concentraciones circulantes de AMH (Lahoz *et al.*, 2012). La ocurrencia más temprana de la pubertad determina la sucesión de una mayor cantidad de ciclos estrales previo a la estación de cría, lo que se traduce en una mayor fertilidad al primer servicio (Byerley *et al.*, 1987), y los mayores niveles de progesterona tienen un impacto positivo en el desarrollo embrionario (Diskin *et al.*, 2006), contribuyendo a una concepción más temprana. A pesar de que el RMFA y la AMH son características fenotípicas que se expresan temprano y son repetibles en la vida del animal (Ireland *et al.*, 2008), sus usos al destete como una herramienta para descartar vaquillonas menos fértiles no han sido extensamente evaluados (Morotti *et al.*, 2017).

Las hipótesis de éste trabajo son: 1) el RMFA es repetible entre las evaluaciones al destete y pre-servicio, lo que permitiría seleccionar animales más fértiles a una edad más temprana; 2) vaquillonas con alto RMFA tienen parámetros de crecimiento y desarrollo compatibles con una pubertad más temprana, lo que puede estar relacionado con preñez

¹ DMTV, MSc., PhD., Programa Nacional de Investigación Producción Carne y Lana, INIA Tacuarembó

² DCV, Pasante INIA Tacuarembó, Programa Nacional de Investigación Producción Carne y Lana

³ Polo Agroforestal, UdelaR, EEER, km 408, Ruta 26, Cerro Largo

⁴ PhD, USDA, ARS, U.S. Meat Animal Research Center, Clay Center, NE, USA

más temprana; 3) el RMFA tiene una alta correlación con las concentraciones de AMH, por lo que ambos parámetros podrían ser utilizados de forma indistinta.

Los objetivos de éste trabajo fueron evaluar la repetibilidad del RMFA al destete y pre-servicio, su correlación con la AMH, parámetros de crecimiento y desarrollo, edad a la pubertad, concentraciones de progesterona en el ciclo pos-inseminación y preñez a los 13-15 meses en vaquillonas Hereford y Braford.

Materiales y métodos

Ubicación y animales

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética para el Uso de Animales (CEUA, número de expediente 2013.13). Se utilizaron hembras Hereford y Braford en dos años distintos (2013-2014: Año 1 y 2015-2016: Año 2), en un diseño experimental completamente al azar. El período de evaluación comenzó con la selección al destete de las terneras y finalizó con el diagnóstico de gestación, 30 días después del retiro de los toros del rodeo. El número de animales utilizados fue 42 Hereford y 40 Braford en el Año 1 y 50 animales de cada raza en el Año 2. Las terneras eran hijas de al menos 7 padres diferentes por raza. Las vaquillonas Hereford fueron manejadas siempre en la Unidad Experimental Glencoe y las vaquillonas Braford en la Unidad Experimental La Magnolia, ambas de INIA Tacuarembó.

Peso vivo, edad al inicio de las evaluaciones y alimentación

En el Año 1, los animales fueron seleccionados al destete en abril, con un peso vivo de $189 \pm 2,2$ kg y $189 \pm 2,5$ kg y 198 ± 3 días y 182 ± 3 días de edad, para hembras Hereford y Braford respectivamente. Desde el destete hasta mediados de setiembre las terneras pastorearon campo natural del ecosistema Campos (Allen *et al.*, 2011) con una oferta de forraje de 10 kg de materia seca por kilo de peso vivo (kg MS / kg PV) (Sollenberger *et al.*, 2005) y concentrado *ad libitum* en un

comedero de autoconsumo. A partir de ahí, la dieta de las vaquillonas pasó a estar constituida por mejoramientos de campo natural durante 4 horas por día a una oferta forrajera de 7 kg MS / kg PV y el concentrado fue ajustado al 1% del peso vivo. El concentrado proporcionó 14 % de proteína bruta (PB) y 3 Mcal de energía metabolizable (EM) / kg MS. La ganancia promedio durante el período de recría fue de $0,700 \pm 0,1$ kg en las Hereford y de $0,681 \pm 0,1$ kg en las vaquillonas Braford, llegando al entore (a los 13-15 meses) con un peso promedio de $356 \pm 3,5$ kg y $322 \pm 3,9$ kg respectivamente. Desde el inicio hasta el final del período de servicio, las vaquillonas pastorearon campo natural con una asignación de forraje de 7 kg MS / kg de PV.

En el Año 2, las terneras fueron destetadas en marzo (Hereford) y abril (Braford), con un peso vivo de $164 \pm 2,5$ y $168 \pm 3,6$ kg de peso vivo y 165 ± 2 días y 174 ± 3 días de edad respectivamente. Durante la recría pastorearon verdeos de invierno (Raigrás y Avena) con una asignación de forraje promedio de 1,1 kg MS / kg de PV en ambos rodeos. Todas las hembras fueron suplementadas con granos secos de destilería con solubles (DDGS) de maíz (22,6 % de PB digestible y 2,8 Mcal/kg MS EM). Se comenzó con una suplementación a razón del 1,2 % del peso vivo para finalizar en 0,7 %. La ganancia promedio de la recría fue de $0,855 \pm 0,1$ kg en las Hereford y de $0,669 \pm 0,1$ kg en las Braford, llegando al entore (a los 13-15 meses) con un peso promedio de $378 \pm 3,8$ kg y $312 \pm 4,6$ kg en Hereford y Braford; respectivamente. Durante el servicio, los animales Hereford pastorearon campo natural y sorgo forrajero y los Braford Setaria, con una disponibilidad mínima de 7 kg MS /kg PV y 1 kg MS / kg PV, en pasturas naturales y anuales de verano; respectivamente.

Servicios

En el Año 1, todas las vaquillonas cíclicas se sincronizaron con el protocolo Ovsynch (Pursley *et al.*, 1995) con el agregado de un dispositivo que contenía progesterona. Fueron inseminadas artificialmente a tiempo fijo

(52 a 60 horas después de la administración de Cloprostenol), utilizando semen congelado de dos toros por raza con más del 60% de espermatozoides móviles después del descongelado. Diez días más tarde, se introdujo en cada rodeo un solo toro cuya aptitud reproductiva fue evaluada previamente, por un período adicional de 50 días.

En el Año 2, las vaquillonas fueron sincronizadas con prostaglandina F2 α sintética (Cloprostenol-D, 150 mg i/m, Dalmaprost® Laboratorio Fatro, Uruguay), realizándose la inseminación a celo visto por 5 días. Se utilizó semen congelado de dos toros por cada raza, bajo las mismas condiciones que en el Año 1. Finalizada la inseminación, se introdujo en cada rodeo un solo toro cuya aptitud reproductiva fue evaluada previamente, por un período adicional de 50 días. Los inseminadores fueron dos técnicos entrenados y trabajaron en ambos rodeos y años.

Determinaciones en los animales

Recuento de folículos antrales

Se evaluó el recuento de folículos antrales (RFA) en ambos ovarios, registrándose en

mapas ováricos el diámetro, número y posición de todos los folículos ≥ 2 mm. Las evaluaciones se llevaron a cabo en dos momentos (pos-destete = 246 días de edad promedio y pre-servicio = 385 días de edad promedio) utilizando un ecógrafo de modo B en tiempo real y una sonda transrectal de 7,5 MHz (Aloka Co., Ltd., Tokio, Japón). El mismo operador realizó todas las mediciones en el mismo año, pero fueron diferentes entre años. En el Año 1 la evaluación se realizó día por medio, completando 6 días de evaluación para cada animal y para cada momento (pos-destete y pre-servicio), mientras que en el Año 2, se realizó durante 5 días consecutivos en ambos momentos. En el año 2, la ecografía diaria permitió definir la emergencia de una onda folicular en un total de 37 vaquillonas. La emergencia de la onda fue definida realizando el seguimiento retrospectivo del folículo dominante de esa onda, cuando tenía un diámetro ≥ 5 mm (Día 0= emergencia del folículo dominante). El recuento máximo de folículos antrales (RMFA) para cada animal, fue el día durante cada seguimiento (pos-destete y pre-servicio) en que se registró la mayor población total (suma de ambos ovarios) de folículos antrales ≥ 2 mm.



Figura 8. Metodología empleada para realizar el recuento de folículos antrales en terneras al destete, utilizando una sonda rígida de manipulación externa. A: Imagen de un ovario con bajo recuento folicular; B: imagen de un ovario con alto recuento folicular.

En la evaluación pos-destete se utilizó una sonda rígida que fue manipulada externamente (Figura 8) utilizando la metodología descrita por Viñoles *et al.* (2010), en la cual los ovarios son visualizados utilizando la vejiga y el útero como estructuras de referencia y rotando la sonda en el sentido de las agujas del reloj para localizar el ovario izquierdo y en sentido contrario a las agujas del reloj para localizar el derecho.

Para el seguimiento pre-servicio los animales fueron sincronizados con dos dosis de prostaglandina F2 α sintética (Cloprostenol-D, 150 mg i/m, Dalmaprost® Laboratorio Fatro, Uruguay) administradas con un intervalo de 11 días. La evaluación comenzó 48 horas después de la segunda dosis y en este caso se utilizó una sonda flexible, palpándose los ovarios y colocándolos directamente debajo de la sonda.

Muestras sanguíneas y determinaciones hormonales

Se recolectaron muestras sanguíneas por venopunción yugular todos los días en los momentos de evaluación de la cuenta folicular, y entre ambos momentos la frecuencia de muestreos sanguíneos se redujo a dos veces por semana. La recolección de sangre se interrumpió en aquellas vaquillonas que habían alcanzado la pubertad evidenciado por la presencia de un cuerpo lúteo en la evaluación pre-servicio, pero en las restantes se continuó hasta el final del período de servicio. Este patrón de muestreos fue definido para: 1) determinar la concentración de AMH el día del RMFA en ambos momentos; y 2) conocer con la mayor exactitud posible la fecha de pubertad de cada vaquillona. El suero fue separado por centrifugación durante 10 minutos a 3500 rpm y las muestras se almacenaron a -20°C hasta la determinación de progesterona y AMH.

Las determinaciones hormonales se realizaron en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Las concentraciones de progesterona fueron determinadas por

un radioinmunoensayo (RIA) en fase sólida. En el Año 1 se utilizaron kits DPC (Diagnóstico Product Co., Los Ángeles, CA, EEUU). La sensibilidad del ensayo fue de 0,079 ng/mL y el coeficiente de variación intra-ensayo para los controles de calidad bajo (1 ng/mL) y alto (29 ng/mL) fueron 10% y 8%; respectivamente. En el Año 2 se utilizaron kits de MP (BIOMEDICALS, INC. Solon, OH 44139 USA), la concentración mínima detectable del ensayo fue de 0,1 ng/ml y los coeficientes de variación intra-ensayo para el control bajo (0,94 ng/ml) y el control alto (5,09 ng/ml) fueron 13,6 % y 13,4%; respectivamente.

La concentración de AMH fue determinada solamente el día del RMFA para cada animal en cada evaluación y en los cinco días de evaluación en aquellos animales que se pudo observar la emergencia de la onda folicular (n = 37). Se utilizó el kit de ELISA AL-114 (Ansh Labs, Texas, EEUU), el cual es diseñado para el uso específico en vacas y fue previamente validado en vaquillonas Bradford (Bo *et al.*, 2016) y Hereford (Sequeira *et al.*, 2014). La sensibilidad del ensayo fue de 0,011 ng/mL. En el Año 1 el coeficiente de variación intra-ensayo para los controles de calidad bajo (0,177 ng/mL) y alto (0,379 ng/mL) fueron de 15,7% y 6,8%; respectivamente. Mientras que en el Año 2, los coeficientes de variación intra-ensayo para el control bajo (0,259 ng/ml) y el control alto (0,946 ng/ml) fueron 20,7% y 17,0%; respectivamente.

Parámetros reproductivos

El inicio de la pubertad fue determinado usando las mediciones de progesterona. Una sola muestra con concentraciones ≥ 1 ng/ml o dos muestras consecutivas con concentraciones $\geq 0,5$ ng/ml fueron indicativas de actividad luteal y por tanto de la pubertad.

Se realizó el diagnóstico de gestación y la determinación de la edad embrionaria/fetal cada 30 días, desde el inicio del servicio hasta 30 días después de retirados los toros. Se utilizó un ecógrafo Agroscon con un transductor transrectal lineal dual de 5,0/7,5 MHz (Biotay SA, Montevideo, Uruguay). A su vez,

se determinaron la fecha de concepción, la edad a la concepción y el momento de concepción. La fecha predicha de concepción se calculó restando la edad del embrión o feto a la fecha del diagnóstico de gestación. Utilizando la fecha de concepción y la fecha de nacimiento de cada vaquillona, se calculó su edad en el momento de la concepción. El momento de la concepción fue definido como los días desde el inicio del servicio en que la vaquillona quedó preñada.

Parámetros de crecimiento y desarrollo

Peso vivo

El peso vivo se determinó en todos los animales cada 14 días, desde el inicio del experimento (destete) hasta el final del entore. La medición se realizó siempre por la mañana y utilizando la misma balanza (True test GR 3000s, True-test Corporation Limited, Montevideo, Uruguay). Usando esta información se calculó la ganancia diaria de peso vivo.

Altura de anca

La altura de anca se midió con una regla justo encima de los huesos de la cadera, con los animales parados sobre una superficie plana, la semana siguiente al seguimiento folicular pos-destete y pre-servicio.

Composición corporal

Se estimó mediante ecografía el espesor de grasa (grasa subcutánea que recubre el músculo dorsal largo entre la 12° y 13° costilla, medida en mm), área de ojo de bife (AOB, área del músculo dorsal largo medido en cm²) y el espesor de la grasa en la grupa (espesor de grasa subcutánea en el sitio P8 expresado en mm) el día de medición de la altura de anca. La ecografía de composición corporal fue realizada utilizando un escáner modo B en tiempo real, con un transductor lineal de 3,5 MHz (Aloka Co., Ltd., Tokio, Japón) y se almacenaron en una PC portátil (Houghton y Turlington, 1992). Las imágenes

capturadas en la PC fueron analizadas utilizando el software Biosoft® (Biotronics Inc., Ames, Iowa, EEUU).

Análisis estadísticos

El impacto del RMFA en explicar las variables de interés (crecimiento y desarrollo, edad a la pubertad) se estudió utilizando el dato individual en cada evaluación, para cada raza y año. Esta definición se basó en la alta variabilidad existente en el RMFA entre vaquillonas y la gran variación en los criterios para la clasificación en alto, medio y bajo RMFA (Morotti *et al.*, 2015). En éste trabajo se clasificó a los animales en bajo, medio y alto RMFA utilizando puntos de corte que dividieron a cada población de animales, en cada evaluación y año, en tres tercios. Esta clasificación solamente se utilizó para describir variables relacionadas a la fertilidad, cuando el análisis utilizando el dato de RMFA individual estuvo relacionado con las variables de interés.

Todos los análisis fueron realizados utilizando el Statistical Analysis Software (SAS 9.4, SAS Institute Inc, Cary, Carolina del Norte, EEUU, 2002). Las variables continuas y discretas fueron analizadas mediante modelos lineales generalizados y generalizados mixtos, respectivamente, utilizando los efectos fijos RMFA o clase de RMFA, observación y la interacción entre estos factores. El análisis de los residuales de las variables RMFA y AMH mostró el rechazo de la hipótesis de normalidad (procedimiento univariado, test de Shapiro-Wilk, $P < 0,05$), por lo cual se realizó la transformación logarítmica de los datos para ambas variables. La repetibilidad del RMFA y las concentraciones de AMH medidas con un intervalo de 6 meses (evaluaciones pos-destete y pre-servicio) se estudió mediante análisis de varianza usando la fórmula $r = S^2A / (S^2 + S^2A)$, donde S^2A es la varianza entre grupos y S^2 es la varianza dentro del grupo. Adicionalmente, se estudió la correlación entre el RMFA y las concentraciones de AMH en ambas evaluaciones, para cada raza y año. Únicamente en el Año 2 en que el seguimiento ecográfico

se realizó en forma diaria, se determinó la consistencia de las medidas del recuento de folículos antrales (RFA) (folículos de 2 a 5 mm) y de las concentraciones de AMH para cada evaluación (pos-destete y pre-servicio) y raza (Hereford y Braford) en un subgrupo de vaquillonas (n = 37) en los que se detectó la emergencia de una onda folicular. Para evaluar la relación del RMFA y la concentración de AMH con la edad a la pubertad, y del RMFA con peso vivo, altura y el AOB, se realizaron regresiones múltiples creándose una línea de tendencia y una ecuación de regresión. Las gráficas de regresión se realizaron usando JMP 10 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

La clasificación en RMFA bajo (≤ 21 folículos), medio (22 – 31 folículos) y alto (≥ 32 folículos) solamente fue utilizada para las vaquillonas Braford, en la evaluación pos-destete en el año 2 para evaluar las concentraciones de progesterona en el ciclo pos-inseminación y la frecuencia de animales inseminados y preñados a la inseminación artificial y la preñez final.

Todos los modelos fueron considerados significativos si $P < 0,05$, y las tendencias fueron identificadas cuando $0,05 < P \leq 0,10$.

Resultados

Repetibilidad del RMFA pos-destete y pre-servicio

En el cuadro 1 se presenta la repetibilidad del RMFA para la cuenta pos-destete y pre-servicio por año y por raza. La repetibilidad más alta se observó en el Año 2, para las vaquillonas Braford.

Repetibilidad de la concentración de AMH

En el cuadro 2 se presenta la repetibilidad de la concentración de AMH entre las mediciones pos-destete y pre-servicio. La repetibilidad para la concentración de AMH tuvo un comportamiento similar al RMFA, siendo mayor en el Año 2, en las Braford.

Cuadro 1. Repetibilidad del recuento máximo de folículos antrales (RMFA) mediciones pos-destete y pre-servicio en dos años distintos usando vaquillonas Hereford y Braford.

Año	Raza	RMFA pos-destete promedio (n)	RMFA pre-servicio promedio (n)	Repetibilidad	P
Año 1	Hereford (n = 42)	21,0 ± 0,9	26,9 ± 1,0	0,36	0,009
	Braford (n = 40)	31,0 ± 1,4	37,7 ± 1,4	0,39	0,006
Año 2	Hereford (n = 50)	29,2 ± 1,7	31,2 ± 1,5	0,32	0,01
	Braford (n = 50)	30,2 ± 2,1	38,0 ± 3,0	0,72	< 0,001

Cuadro 2. Repetibilidad de la concentración de hormona anti-Mülleriana (AMH) entre mediciones pos-destete y pre-servicio en dos años distintos usando vaquillonas Hereford y Braford.

Año	Raza	AMH pos-destete promedio (ng/ml)	AMH pre-servicio promedio (ng/ml)	Repetibilidad	P
Año 1	Hereford (n = 42)	0,463 ± 0,089	0,271 ± 0,050	0,50	< 0,001
	Braford (n = 40)	0,462 ± 0,076	0,343 ± 0,048	0,52	< 0,001
Año 2	Hereford (n = 50)	0,511 ± 0,053	0,606 ± 0,050	0,50	< 0,001
	Braford (n = 50)	0,661 ± 0,060	0,887 ± 0,092	0,71	< 0,001

Correlación del RMFA y la concentración de AMH

La correlación entre el RMFA y la concentración de AMH para cada año y raza, incluyendo los valores pos-destete y pre-servicio de cada animal, se presenta en el cuadro 3. En todos los casos la relación entre ambas variables fue significativa ($P < 0,001$), pero las correlaciones fueron mayores para las vaquillonas Braford en el Año 2.

Cuadro 3. Correlación entre el recuento máximo de folículos antrales y la concentración de hormona anti-Mülleriana incluyendo las mediciones pos-destete y pre-servicio en dos años diferentes usando vaquillonas Hereford y Braford

Año	Raza	Correlación	P
Año 1	Hereford (n = 84)	0,38	< 0,01
	Braford (n = 80)	0,44	< 0,001
Año 2	Hereford (n = 100)	0,64	< 0,001
	Braford (n = 100)	0,85	< 0,001

Consistencia de las mediciones del RFA y AMH durante evaluaciones diarias

En el Año 2, en que las mediciones de RFA y AMH fueron realizadas durante 5 días consecutivos, se evaluó la consistencia de las mismas para ambos momentos (pos-destete y pre-servicio) y para ambas razas (Hereford y Braford) utilizando un subgrupo de vaquillonas (n = 37). La consistencia del recuento de folículos de 2 – 5 mm en la evaluación pos-destete fue 0,87 (n = 10) para las vaquillonas Hereford y 0,94 (n = 10) para las Braford y en la evaluación pre-servicio de 0,79 (n = 9) y 0,93 (n = 8) para las vaquillonas Hereford y Braford, respectivamente.

La consistencia de las mediciones de AMH en cada evaluación (pos-destete y pre-servicio) fue evaluada utilizando el mismo subgrupo de vaquillonas. En Hereford, la consistencia para la evaluación pos-destete y pre-servicio fue 0,89 (n = 10) y 0,95 (n = 9) respectivamente; y en Braford para la evaluación pos-destete fue 0,92 (n = 10) y para la pre-servicio 0,94 (n = 8). Se observó mínima variación diaria en las concentraciones de AMH de este subgrupo ($P = 0,45$; Figura 9), y mínima variación diaria en el número de folículos de 2 – 5 mm ($P = 0,4$; Figura 9).

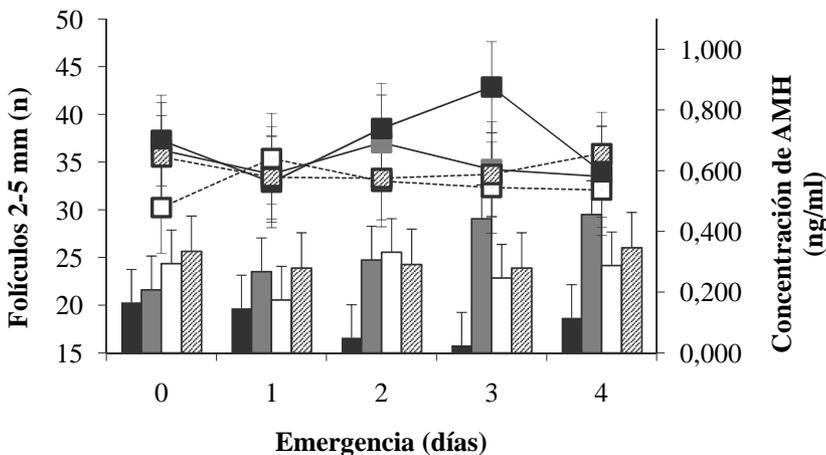


Figura 9. Evolución del número de folículos de 2-5 mm (barras) y la concentración de hormona anti-Mülleriana (AMH) (cuadrados) durante 5 días consecutivos en un sub-grupo de vaquillonas Hereford (barra y cuadrado negro= evaluación pos-destete, n=10; barra y cuadrado gris = evaluación pre-servicio, n=9) y Braford (barra y cuadrado blanco= evaluación pos-destete, n=10; barra y cuadrado rayado= evaluación pre-servicio, n=8) en las cuales pudo seguirse el crecimiento del folículo dominante. El día 0 corresponde a la emergencia de la onda folicular en cada animal, evaluada retrospectivamente al momento en que el folículo dominante tenía un diámetro ≥ 5 mm.

Relación RMFA con parámetros reproductivos

En el Año 1, en las vaquillonas Hereford y Braford, y en el Año 2 en las Hereford, las evaluaciones pos-destete no evidenciaron relación entre el RMFA y parámetros reproductivos (edad a la pubertad, momento de concepción, edad a la concepción y preñez final). Sin embargo, en el Año 2, en las vaquillonas Braford la evaluación pos-destete evidenció que animales con mayor RMFA alcanzaron la pubertad a una edad más temprana ($r^2 = 0,129$; $P = 0,0196$; Figura 10). La ecuación que mejor describe ésta relación es $\text{pubertad} = 483,79704 - 27,503385 * \log \text{RMFA}$. La edad promedio a la pubertad de cada grupo (bajo = $418,7 \pm 9,0$ días; medio = $379,2 \pm 8,4$ días y alto = $383,4 \pm 8,7$ días) determinó que una menor proporción de vaquillonas de bajo RMFA fueran inseminadas al inicio del período de servicios (2/16), compradas con las de RMFA medio (12/17) y alto (7/17; $P < 0,01$). Sin embargo, no se observaron diferencias en la proporción de vaquillonas preñadas a la inseminación, el

momento, ni la edad a la concepción entre grupos (bajo RMFA = 0/2, $28,6 \pm 4,9$ días y $429,9 \pm 7,1$ días; medio RMFA = 6/11, $23,0 \pm 4,4$ días y $419,1 \pm 6,5$ días; alto RMFA = 4/7, $24,3 \pm 4,2$ días y $431,2 \pm 6,5$ días; respectivamente; $P > 0,05$). La preñez final fue similar para las vaquillonas de bajo (11/16), medio (13/17) y alto (13/17) RMFA ($P > 0,05$).

En la evaluación pre-servicio no se encontraron asociaciones entre RMFA y variables reproductivas en ninguno de los años ni razas.

Relación entre la concentración de AMH y los parámetros reproductivos

En las vaquillonas Braford durante el Año 2, se observó una relación entre el logaritmo de AMH y la edad a la pubertad, tal que a mayores concentraciones de AMH, menor edad a la pubertad ($r^2 = 0,135$; $P = 0,0168$; Figura 11). La ecuación que mejor describe ésta relación es $\text{pubertad} = 381,56734 - 18,446481 * \log \text{AMH}$.

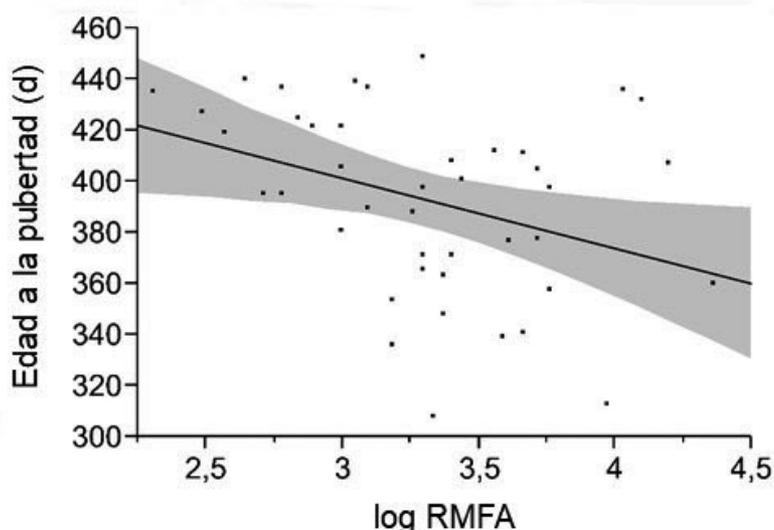


Figura 10. Regresión de la edad a la pubertad con el logaritmo del recuento máximo de folículos antrales (RMFA) pos-destete, en vaquillonas Braford, durante el Año 2 ($n = 50$). El área sombreada representa el intervalo de confianza de 95 %.

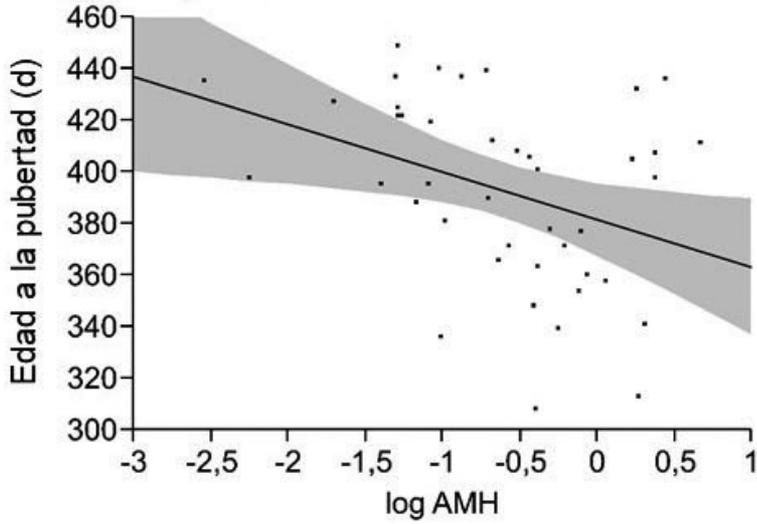


Figura 11. Regresión de la edad a la pubertad con el logaritmo de la concentración de hormona anti-Mülleriana (AMH) pos-destete, en vaquillonas Braford, durante el Año 2 (n = 50). El área sombreada representa el intervalo de confianza de 95 %.

Relación del RMFA con las concentraciones de progesterona

En las vaquillonas Braford del Año 2, las concentraciones de progesterona en el ciclo pos-inseminación estuvieron afectadas por

la clase de RMFA, el día y la interacción de ambas (P < 0,001), dado que las terneras de clase baja tuvieron menores concentraciones de progesterona a partir del día 10 del ciclo comparado con aquellas de clase media y alta (Figura 12).

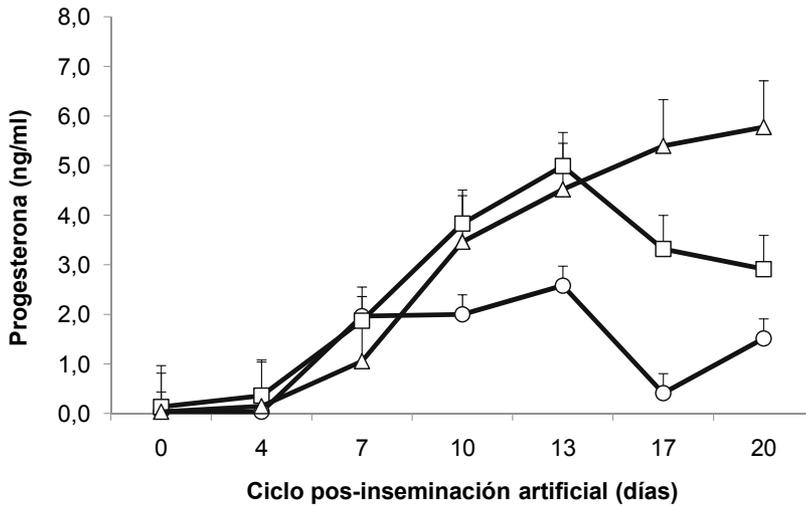


Figura 12. Concentraciones de progesterona en el ciclo pos-inseminación artificial, en vaquillonas Braford del Año 2, con bajo (círculo, n=2), medio (cuadrado, n=9) y alto (triángulo, n=6) recuento de foliculos antrales.

Relación RMFA con parámetros de crecimiento y desarrollo

En el Año 1, no se encontraron asociaciones entre RMFA y los parámetros de desarrollo y composición corporal, en ninguna de las evaluaciones, para ninguna de las razas. Sin embargo, en el Año 2, las asociaciones entre RMFA y los parámetros de desarrollo y composición corporal se observaron en las

vaquillonas Braford, en la evaluación pos-destete. La disminución del RMFA se correspondió con menor peso ($r^2 = 0,146$; $P < 0,01$), altura ($r^2 = 0,159$; $P < 0,01$) y AOB ($r^2 = 0,111$; $P = 0,018$; Figura 13). Las ecuaciones que describen éstas relaciones son peso = $122,9377 + 23,796473 * \log \text{RMFA}$, altura anca = $97,320422 + 3,6574946 * \log \text{RMFA}$ y AOB = $26,445724 + 4,2351617 * \log \text{RMFA}$.

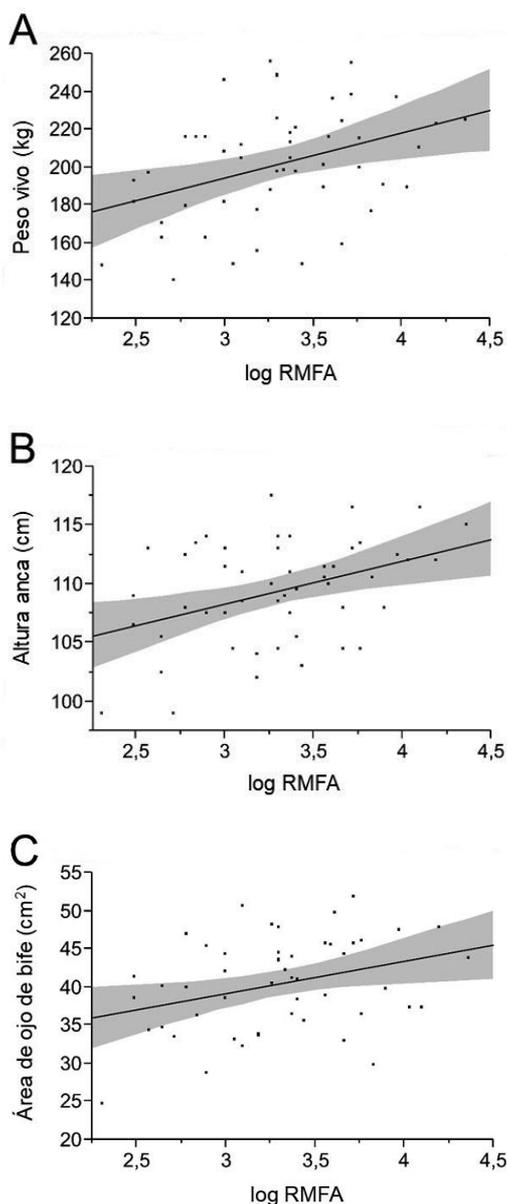


Figura 13. Relación del logaritmo del recuento máximo de folículos antrales (RMFA) con el peso vivo (A), altura de anca (B) y área de ojo de bife (C) en vaquillonas Braford, Año 2, en la evaluación pos-destete. El área sombreada representa el intervalo de confianza de 95 %.

En el mismo año y con la misma raza pero en la evaluación pre-servicio, las vaquillonas con menos RMFA siguieron siendo más bajas ($P = 0,0042$) y tuvieron menos AOB ($P = 0,0307$).

Discusión

Este es uno de los primeros trabajos que usa el RMFA al destete como herramienta de selección precoz de reemplazos. Las hipótesis testeadas en este estudio fueron parcialmente aceptadas. El RMFA fue repetible entre las evaluaciones pos-destete y pre-servicio solamente en uno de cuatro casos. En ese único caso (vaquillonas Braford del Año 2) en que la repetibilidad fue alta, encontramos una relación entre el RMFA y parámetros que describen el crecimiento y desarrollo, por lo que las vaquillonas con menor RMFA crecieron de forma más lenta y alcanzaron la pubertad más tarde. Además, en las vaquillonas Braford del año 2 se encontró una alta correlación entre el RMFA y la concentración de AMH, sugiriendo que ambas variables pueden utilizarse de manera indistinta para seleccionar hembras al destete. Nuestros resultados refuerzan el concepto de que el inicio de la pubertad es un proceso complejo que se ve afectado entre otros factores por el peso vivo, la tasa de crecimiento y la raza; y que por esto una única medida del RMFA o de la concentración de AMH al destete pueden no ser técnicas útiles para seleccionar vaquillonas más fértiles, por lo menos en la raza Hereford.

La repetibilidad del RMFA observada en vaquillonas Braford en el Año 2, fue muy buena aunque no tan alta como la previamente reportada por Burns *et al.*, (2005); Rico *et al.*, (2009) y Souza *et al.*, (2015) (0,87- 0,95). Este resultado positivo indicaría que para este caso, la selección de hembras al destete puede ser posible, sin embargo, nuestros resultados fueron pobres en los restantes casos (Año 1, vaquillonas Hereford y Braford y Año 2, vaquillonas Hereford). Los pobres resultados podrían estar relacionados con la metodología utilizada en los diferentes experimentos y al momento fisiológico en que se

encontraban los animales (pre vs peri-púberes). En la evaluación pos-destete se utilizó una sonda rígida, de manipulación externa, mientras que en la evaluación pre-servicio se utilizó una sonda flexible, y esto podría estar afectando la repetibilidad obtenida en este estudio. Los ovarios, en la evaluación pos-destete, fueron visualizados utilizando la vejiga y el útero como estructuras de referencia y rotando la sonda en sentido horario para ubicar al ovario izquierdo y anti-horario para ubicar el ovario derecho, de la misma forma que lo descrito para la oveja (Viñoles *et al.*, 2010). Sin embargo, en la evaluación pre-servicio los ovarios se palpaban, y se colocaron debajo de la sonda, obteniéndose una mayor definición de su estructura anatómica. La menor repetibilidad del RMFA obtenida utilizando la sonda rígida en animales peri-púberes ha sido reportada previamente (Lents *et al.*, 2014). Otro factor que puede estar afectando los resultados es que la repetibilidad fue medida considerando solamente el día de máxima cuenta folicular (RMFA), en dos mediciones separadas por 6 meses, en animales pre-púberes en la primera medición, y peri-púberes en la segunda. Los resultados de repetibilidad presentados por Ireland *et al.*, (2008) son de animales púberes sincronizados, en que se evaluó la cuenta máxima en ondas sucesivas del ciclo estral, realizando dos ecografías diarias. Esta diferencia metodológica es relevante por dos motivos: 1) los complejos cambios hormonales que ocurren alrededor de la pubertad, pueden estar afectando secundariamente la transición y la dinámica del pool de folículos antrales (Yelich *et al.*, 1996); 2) la probabilidad de que dos mediciones sean iguales es mayor cuando son más cercanas en el tiempo (Littell *et al.*, 1998). Sin embargo, investigaciones recientes (Morotti *et al.*, 2017) reportaron en ganado Braford alta repetibilidades (0,90 a 0,92) del RMFA entre mediciones al destete y al año de edad. Esto refuerza los buenos resultados obtenidos en las vaquillonas Braford del Año 2, e indica que la realización del RMFA al destete puede ser una herramienta que permita predecir la performance reproductiva en esta raza al servicio.

Un resultado relevante de éste trabajo tiene que ver con el momento del ciclo en el que se debe realizar la evaluación del RFA. En nuestro experimento, las vaquillonas fueron examinadas ultrasonográficamente por 5 a 10 días, con el objetivo de capturar la emergencia de al menos una onda folicular. Las primeras publicaciones en esta área fueron realizadas conociendo el día de la emergencia de la onda (Burns *et al.*, 2005), pero la metodología fue modificada para simplificar su uso en condiciones de campo (Martinez *et al.*, 2016). Gobikrushanth *et al.* (2017) observaron una baja repetibilidad (0,37) entre la cuenta folicular realizada en un único día conociendo o no el momento del ciclo. Sin embargo, nuestros resultados indican que un única medición en un momento desconocido del ciclo estral sería posible y permitiría una mayor aplicación productiva. En el Año 2, el número de folículos de 2 – 5 mm evaluados durante 5 días consecutivos, fue altamente consistente, particularmente en las hembras Braford. La mínima variación diaria del número de folículos de esta clase está en concordancia con la descripción de las ondas foliculares en vacas (Rajakoski, 1960) y ovejas (Bartlewski *et al.*, 1999), lo que refuerza el concepto de que una única medida en un día desconocido del ciclo estral es también correcta desde el punto de vista biológico.

Solamente en vaquillonas Braford en el segundo año de evaluación, el RMFA pos-destete permitió identificar las vaquillonas que alcanzarían la pubertad antes. Este resultado puede estar explicado por dos factores: 1) diferencias raciales en edad a la pubertad, ya que *Bos Indicus* y sus cruza alcanzan la pubertad más tarde (Nogueira, 2004), y 2) diferencias en los planos nutricionales entre años y razas, lo cual provocó menores tasas de ganancia diaria y peso vivo pre-servicio en las vaquillonas Braford. Ambos, nutrición y genética se combinaron para estimular una pubertad más temprana en las vaquillonas Hereford, las cuales estaban más cerca del límite biológico para esta raza. Debido a que más vaquillonas Hereford al momento de la evaluación pre-servicio estaban en el período

peri-puberal, los cambios hormonales y su impacto en el crecimiento folicular durante este período fisiológico, podrían estar impidiendo lograr una buena repetibilidad entre ambas mediciones (pos-destete y pre-servicio). Sin embargo, en las vaquillonas Braford existe margen de mejora en el plano nutricional por lo que el uso de una herramienta adicional como el RMFA puede haber colaborado en la selección de hembras más precoces. En el Año 2, vaquillonas Braford con menos RMFA tuvieron menor crecimiento y desarrollo, pudiendo esto explicar la demora en alcanzar la pubertad y la menor proporción de vaquillonas inseminadas. A su vez, esas vaquillonas con reducido número de folículos antrales, tuvieron menos concentraciones de progesterona en el ciclo pos-inseminación. Esto no resultó, sin embargo, en diferencias en el momento de concepción o en el porcentaje de preñez final. Trabajos previos en ganado para carne no encontraron una relación beneficiosa entre el RMFA y la pubertad (Cushman *et al.*, 2014; Mossa *et al.*, 2013), pero si se ha descrito que vaquillonas con alto RMFA tienen mayores concentraciones de progesterona (presente estudio, (Jimenez-Krassel *et al.*, 2009)). Además, vaquillonas con mayor RFA presentan un mayor tamaño uterino y contenido de proteína uterina, lo que indica la existencia de un ambiente más auspicioso para el desarrollo embrionario, variables que podrían explicar la concepción más temprana respecto a vaquillonas con menor RFA (Cushman *et al.*, 2014; Jimenez-Krassel *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2016; McNeel *et al.*, 2017; McNeel y Cushman, 2015). El incremento en las concentraciones de progesterona en vaquillonas con alto RMFA después del día 10 del ciclo estral, podría contribuir a un incremento en el elongamiento del embrión y favorecer el reconocimiento materno de la preñez (Diskin y Niswender, 1989). Es importante considerar que estos son los primeros datos generados en nuestras condiciones, y con un número muy reducido de vaquillonas, particularmente en la clase de bajo RMFA. En el mismo sentido, la evaluación de variables reproductivas como el momento de concepción y la tasa de preñez final requieren de un número

elevado de vaquillonas, lo que podría explicar en parte las similitudes entre las distintas clases de RMFA en este estudio. Por lo tanto, se requiere más estudios para confirmar la asociación entre bajas concentraciones de progesterona en vaquillonas Braford con bajo RMFA y su relación con la fertilidad.

La relación entre RMFA y parámetros que describen el crecimiento y desarrollo fue también observada solamente en las vaquillonas Braford en el Año 2. Los resultados sugieren que vaquillonas con menor RMFA fueron más livianas, tuvieron menor AOB y fueron más bajas, que las de medio y alto RMFA. Estos resultados concuerdan con datos publicados anteriormente (Eborn *et al.*, 2013), y sugieren que la nutrición pre y pos-natal podrían afectar la reserva ovárica (Amundson *et al.*, 2015; Evans *et al.*, 2012; Mossa *et al.*, 2013). La asociación de los parámetros de crecimiento y desarrollo con la edad a la pubertad (Patterson *et al.*, 1992) sugiere que vaquillonas con un mayor potencial de crecimiento alcanzan el porcentaje de peso adulto crítico para comenzar a ciclar a una edad más temprana. Sin embargo, se debe tener la precaución de evitar la selección de animales excesivamente grandes y pesados, que podría tener consecuencias negativas en la fertilidad, particularmente considerando las restricciones anuales en el consumo de energía en sistemas pastoriles (Do Carmo *et al.*, 2016; Jenkins, 2009). Por este motivo no se recomienda el uso únicamente del peso vivo como herramienta para seleccionar vaquillonas de reemplazo, sino que es importante considerar la fecha de nacimiento de esos animales (Roberts *et al.*, 2017).

En nuestro experimento, el RMFA y la AMH se correlacionaron positivamente en todos los análisis, aunque con coeficientes menores a los reportados previamente (Ireland *et al.*, 2008). La correlación observada en el año 2 en ambas razas fue buena, pero no en el año 1. Además, la repetibilidad de la concentración de AMH promedio fue mayor a la observada con el RMFA, siendo moderada en tres casos (Año 1, Hereford y Braford y Año

2, Hereford) y muy buena en el restante, Braford del Año 2 (0,71). Estos resultados coinciden con reportes previos (Rico *et al.*, 2009) e indican que la AMH podría ser usada para seleccionar al destete las vaquillonas Braford más precoces. Inicialmente, se planteó que una de las ventajas más importantes del uso de la AMH respecto al RMFA, era su estabilidad a lo largo del ciclo estral (Ireland *et al.*, 2008). Sin embargo, trabajos posteriores y el nuestro demuestran que el RFA (contando folículos ≥ 2 mm), puede realizarse en cualquier momento del ciclo estral. Los folículos de 2 mm, representan un alto porcentaje de los folículos antrales presentes en el ovario (Rajakoski, 1960), y no serían afectados por las variaciones en la concentración de FSH como los folículos ≥ 3 mm (Martinez *et al.*, 2016). Otros aspectos relevantes a favor del uso del RFA son: la información se obtiene al pie del animal, permite evaluar el desarrollo del tracto reproductivo en vaquillonas pre-servicio y su costo es menor que el del análisis de AMH (3,5 vs 9,7 dólares por animal sin tener en cuenta los honorarios del laboratorio). Sumado a esto, se han reportado importantes variaciones en la concentración de AMH para la misma muestra en el mismo laboratorio (Cushman, com. pers; Sanderson, com. pers), por lo que se requieren ajustes en la metodología del análisis de AMH. La asociación entre ambas variables sugiere que podrían ser utilizadas de manera indistinta para seleccionar al destete aquellas vaquillonas Braford que consecuentemente alcanzarían la pubertad tempranamente, aunque sería útil tener en cuenta las ventajas y desventajas de cada alternativa, como fue previamente desarrollado.

Conclusión

Los resultados de estos experimentos muestran que el RMFA y la concentración de AMH no son útiles para la selección de hembras Hereford pos-destete o pre-servicio. Sin embargo, el RMFA y la concentración de AMH pos-destete podrían ser utilizados para seleccionar vaquillonas Braford que alcanzan la pubertad a una menor edad. Adicionalmente, la evaluación puede ser realizada en

cualquier día del ciclo estral, haciendo esta técnica aplicable a los sistemas de producción de carne. Vaquillonas Braford que tienen un mayor RMFA tienen parámetros de crecimiento y desarrollo más acelerados, lo que puede contribuir con una pubertad más precoz. Estos resultados son relevantes para el sector criador, ya que permitiría eliminar del rodeo a vaquillonas menos fértiles a temprana edad (destete) que serán destinadas a la venta o al engorde con la consecuente mejora en el retorno económico de ésta actividad en varias fases del sistema productivo (ej. Rodeo de cría y feedlot). Sin embargo, se requieren más estudios con mayor número de vaquillonas Braford para probar la validez del RMFA y la AMH como herramientas de selección temprana. Estas técnicas no deben aplicarse en forma aislada, sino asociadas a un plano nutricional que estimule un adecuado crecimiento y desarrollo de las vaquillonas de reemplazo.

Referencias bibliográficas

- Allen, V.G., Batello, C., Berretta, E.J., Hodgson, J., Kothmann, M., Li, X., McIvor, J., Milne, J., Morris, C., Peeters, A., Sanderson, M.**, 2011. An international terminology for grazing lands and grazing animals. *Grass Forage Sci.* 66, 2–28. doi:10.1111/j.1365-2494.2010.00780.x
- Amundson, O.L., Fountain, T.H., Larimore, E.L., Richardson, B.N., McNeel, A.K., Wright, E.C., Keisler, D.H., Cushman, R.A., Perry, G.A., Freetly, H.C.**, 2015. Post-weaning nutritional programming of ovarian development in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 93, 5232–5239. doi:10.2527/jas2015-9067.
- Bartlewski, P.M., Beard, A.P., Cook, S.J., Chandolia, R.K., Honaramooz, A., Rawlings, N.C.**, 1999. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J. Reprod. Fertil.* 115, 111–24. doi:10.1530/JRF.0.1150111.
- Bo, G., Anduaga, I., Bernal, B., Moreira, G., Cedeno, A., Barajas, J., Pelizzari, M., Andrada, S., Tribulo, A.**, 2016. Serum AMH concentrations and *in vitro* embryo production in beef cattle., in: 42nd International Embryo Transfer Society Annual Meeting. Louisville, Kentucky, USA, p. Poster session.
- Burns, D., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J., Knight, P., Ireland, J.**, 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-Stimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.* 73, 54–62. doi:10.1095/biolreprod.104.036277.
- Byerley, D.J., Staigmiller, R.B., Berardinelli, J.G., Short, R.E.**, 1987. Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. *J. Anim. Sci.* 65, 645–650.
- Cushman, R.A., McNeel, A.K., Freetly, H.C.**, 2014. The impact of cow nutrient status during the second and third trimesters on age at puberty, antral follicle count, and fertility of daughters. *Livest. Sci.* 162, 252–258. doi:10.1016/j.livsci.2014.01.033.
- Diskin, M.G., Murphy, J.J., Sreenan, J.M.**, 2006. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 96, 297–311. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.08.008.
- Diskin, M.G., Niswender, G.D.**, 1989. Effect of progesterone supplementation on pregnancy and embryo survival in ewes. *J. Anim. Sci.* 67, 1559–1563.
- Do Carmo, M., Claramunt, M., Carriquiry, M., Soca, P.**, 2016. Animal energetics in extensive grazing systems: Rationality and results of research models to improve energy efficiency of beef cow-calf grazing campos systems. *J. Anim. Sci.* 94, 84–92. doi:10.2527/jas.2016-0596.

- Eborn, D., Cushman, R., Echterkamp, S.,** 2013. Effect of postweaning diet on ovarian development and fertility in replacement beef heifers. *J. Anim. Sci.* 91, 4168–4179.
- Edwards, S.J., Juengel, J.L., O’Connell, A.R., Johnstone, P.D., Farquhar, P.A., Davis, G.H.,** 2015. Attainment of puberty by ewes in the first year of life is associated with improved reproductive performance at 2 years of age. *Small Rumin. Res.* 123, 118–123. doi:10.1016/j.smallrumres.2014.11.006.
- Engelken, T.J.,** 2008. Developing replacement beef heifers. *Theriogenology* 70, 569–572. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.05.032.
- Evans, A.C., O., Mossa, F., Walsh, S.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Ireland, J.J.,** 2012. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 31–37. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x
- Gobikrushanth, M., Dutra, P.A., Bruinjé, T.C., Colazo, M.G., Butler, S.T., Ambrose, D.J.,** 2017. Repeatability of antral follicle counts and anti-Müllerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. *Theriogenology* 92, 90–94. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.01.018.
- Guggeri, D., Meikle, A., Carriquiry, M., Montossi, F., De Barbieri, I., Viñoles, C.,** 2014. Effect of different management systems on growth, endocrine parameters and puberty in Hereford female calves grazing Campos grassland. *Livest. Sci.* 167, 455–462. doi:10.1016/j.livsci.2014.06.026.
- Ireland, J., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G., Perez, G., Evans, A., Ireland, J.,** 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol. Reprod.* 79, 1219–1225. doi:10.1095/biolreprod.108.071670.
- Jenkins, T.G.,** 2009. Interbreed evaluation of beef productivity under low and moderate dry matter availabilities. *Assoc. Adv. Anim. Breed. Genet.* 18, 113–116.
- Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Hou, X., Davis, J.S., Lonergan, P., Evans, A.C.O., Ireland, J.J.,** 2009. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *Biol. Reprod.* 80, 1272–1281. doi:10.1095/biolreprod.108.075093.
- Lahoz, B., Alabart, J.L., Monniaux, D., Mermillod, P., Folch, J.,** 2012. Anti-Müllerian hormone plasma concentration in prepubertal ewe lambs as a predictor of their fertility at a young age. *BMC Vet. Res.* 8, 118. doi:10.1186/1746-6148-8-118.
- Lents, C.A., Cushman, R.A., Freking, B.A.,** 2014. Measures of the ovaries and uterus during development of gilts selected for differences in uterine capacity. *J. Anim. Sci.* 92, 2433–2439. doi:10.2527/jas2013-7205.
- Lesmeister, J.L., Burfening, P.J., Blackwell, R.L.,** 1973. Date of first calving in beef cows and subsequent calf production. *J. Anim. Sci.* 36, 1–6. doi:10.2134/jas1973.3611.
- Littell, R.C., Henry, P.R., Ammerman, C.B.,** 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76, 1216–1231. doi:10.2527/1998.7641216x.
- Martinez, M.F., Sanderson, N., Quirke, L.D., Lawrence, S.B., Juengel, J.L.,** 2016. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. *Theriogenology* 85, 466–475. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.09.026.

McNeel, A.K., Cushman, R.A., 2015. Influence of puberty and antral follicle count on calving day in crossbred beef heifers. *Theriogenology* 84, 1061–1066. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.06.010.

McNeel, A.K., Soares, É.M., Patterson, A.L., Vallet, J.L., Wright, E.C., Larimore, E.L., Amundson, O.L., Miles, J.R., Chase, C.C., Lents, C.A., Wood, J.R., Cupp, A.S., Perry, G.A., Cushman, R.A., 2017. Beef heifers with diminished numbers of antral follicles have decreased uterine protein concentrations. *Anim. Reprod. Sci.* 179, 1–9. doi:10.1016/j.anireprosci.2017.01.004.

Morotti, F., Barreiros, T.R.R., Machado, F.Z., González, S.M., Marinho, L.S.R., Seneda, M.M., 2015. Is the number of antral follicles an interesting selection criterium for fertility in cattle ? 479–486.

Morotti, F., Santos, G.M.G., Júnior, C.K., Silva-Santos, K.C., Roso, V.M., Seneda, M.M., 2017. Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in beef heifers. *Theriogenology* 91, 21–26. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.12.025.

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., 2013. Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. *Biol. Reprod.* 8892, 1–9. doi:10.1095/biolreprod.112.107235.

Nogueira, G.P., 2004. Puberty in South American *Bos Indicus* (Zebu) cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 361–372. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.04.007.

Patterson, D.J., Perry, R.C., Kiracofe, G.H., Bellows, R.A., Staigmiller, R.B., Co-rah, L.R., 1992. Management considerations in heifer development and puberty. *J. Anim. Sci.* 70, 4018–4035.

Perry, G.A., 2016. Factors affecting puberty in replacement beef heifers. *Theriogenology* 86, 373–378. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.051.

Perry, G.A., Cushman, R., 2013. Effect of age at puberty/conception date on cow longevity. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 29, 579–590. doi:10.1016/j.cvfa.2013.07.011

Pursley, J.R., Mee, M.O., Wiltbank, M.C., 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. *Theriogenology* 44, 915–923. doi:10.1016/0093-691-X(95)00279-H.

Rajakoski, E., 1960. Ovarian follicular system in sexually mature heifers whit especial reference to seasonal, cyclical and left-right. *Acata Endocrinol.* 34, 1–68.

Rico, C., Fabre, S., Médigue, C., di Clemente, N., Clément, F., Bontoux, M., Touzé, J.-L., Dupont, M., Briant, E., Rémy, B., Beckers, J.-F., Monniaux, D., 2009. Anti-mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol. Reprod.* 80, 50–59. doi:10.1095/biolreprod.108.072157.

Roberts, A.J., Gomes Da Silva, A., Summers, A.F., Geary, T.W., Funston, R.N., 2017. Developmental and reproductive characteristics of beef heifers classified by pubertal status at time of first breeding. *J. Anim. Sci.* 95, 5629–5636. doi:10.2527/jas2017.1873.

Sequeira, M., Guillen, S., Meikle, A., Viñoles, C., 2014. Relación entre la máxima cuenta folicular, las concentraciones de hormona antimülleriana y la concepción en vaquillonas Hereford., in: 2do Congreso de La Sociedad Argentina de Tecnologías Embriónaria Arbitrado. Buenos Aires, Argentina, p. Poster session.

Sollenberger, L.E., Moore, J.E., Allen, V.G., Pedreira, C.G.S., 2005. Reporting forage allowance in grazing experiments. *Crop Sci.* 45, 896–900. doi:10.2135/cropsci2004.0216.

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., 2015. Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98, 169–178. doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8182

Viñoles, C., Gonzalez de Bulnes, A., Martin, G.B., Sales, F., Sale, S., 2010. Chapter 11. Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography. Ed: Luc DesCôteaux, Jill Colloton and Giovanni Gnemi. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA.

Yelich, J. V., Wettemann, R.P., Marston, T.T., Spicer, L.J., 1996. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Domest. Anim. Endocrinol.* 13, 325–338. doi:10.1016/0739-7240(96)00046-X

4. Creep Feeding y recuento folicular. El Creep Feeding no afecta el recuento de folículos antrales al destete

Carolina Viñoles¹, Rodrigo Santa Cruz², Andrea Alvez³

Trabajo presentado en forma de póster en el 10th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS 2018), Foz de Iguazú, Brasil, 2018

Introducción

El creep feeding (CF) es una herramienta nutricional que mejora el crecimiento y el desarrollo de las terneras, se asocia con un aumento en las concentraciones de IGF-I al destete y reduce la edad a la pubertad (Guggeri *et al.* 2014). El CF tiene efectos de largo plazo en la sensibilidad del hígado a la hormona de crecimiento y en la expresión del transcripto de IGF-I en el endometrio asociado a mayores concentraciones de progesterona al momento del reconocimiento materno de la preñez, cambios que podrían incrementar la eficiencia reproductiva al primer servicio (Guggeri *et al.* 2018). Dado que los folículos ováricos son sensibles a la nutrición (Scaramuzzi *et al.* 2011) y el recuento de folículos antrales (RFA) es un marcador fenotípico de fertilidad (Evans *et al.* 2010), nos planteamos la hipótesis de que el CF tendría un efecto positivo en el RFA.

Materiales y métodos

Cuarenta y ocho vacas Hereford y sus terneras de $73 \pm 1,5$ días de edad se asignaron a dos grupos, con dos réplicas: 1) Sin CF (-CF; n = 22); 3) Con CF (+ CF; n = 26). Las vacas pastorearon campo natural con un ajuste inicial en la asignación de forraje superior a 8 kg DM / kg peso vivo para todas las parcelas. La suplementación de las terneras se realizó durante 98 días con gra-

nos secos de destilería con solubles (DDGS) administrados al 40% de la dieta diaria y ajustando la cantidad del suplemento cada 2 semanas, de acuerdo con la evolución del peso vivo y los requerimientos nutricionales correspondientes. El peso vivo y el aumento de peso diario se evaluaron cada dos semanas. Al final del período de suplementación, todas las terneras se sometieron a ecografía transrectal durante 4 días consecutivos, y se contaron los folículos > 2 mm utilizando un equipo Aloka 500 con una sonda transrectal de 7,5 MHz. El peso vivo, la ganancia diaria y el recuento folicular (promedio de los 4 días de seguimiento) se analizaron mediante análisis de varianza, utilizando modelos lineales generalizados utilizando el Statistical Analysis Software (SAS 9,4, SAS Institute Inc, Cary, Carolina del Norte, EEUU, 2002). Los valores se consideraron significativos si $P < 0,05$.

Resultados y discusión

El CF tuvo un efecto positivo en la ganancia de peso promedio diaria (+ CF: $0,982 \pm 0,02$ kg / d vs -CF: $0,832 \pm 0,02$ kg / d; $P < 0,05$) y pesos al destete (+ CF: $205 \pm 1,6$ kg vs. -CF: $191 \pm 1,6$ kg; $P < 0,05$). Sin embargo, estos no se asociaron con diferencias en el RFA, que fueron similares en terneras + CF ($14,3 \pm 1,6$ folículos) y -CF ($16,8 \pm 1,8$ folículos; $P > 0,05$). Concluimos que la CF no modifica el RFA de las terneras al destete.

1 DMTV, MSc., PhD., Programa Nacional de Investigación Producción Carne y Lana, INIA Tacuarembó. Polo Agroforestal, UdelaR, EEER, km 408, Ruta 26, Cerro Largo.

2 DCV, Programa Nacional de Investigación Producción Carne y Lana, INIA Tacuarembó. Polo Agroforestal, UdelaR, EEER, km 408, Ruta 26, Cerro Largo.

3 DCV, Programa Nacional de Investigación Producción Carne y Lana, INIA Tacuarembó.

Referencias bibliográficas

Evans, A.C.O., Mossa, F., Fair, T., Loneragan, P., Butler, S.T., Zielak-Steciwko, A.E., Smith, G.W., Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L.H., Ireland, J.J., 2010. Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 67, 421–429.

Guggeri, D., Meikle, A., Carriquiry, M., De Barbieri, I., Montossi, F., Viñoles, C., 2018. Long - term effect of early nutrition on endocrine parameters and liver and endometrial gene expression of the members of the somatotrophic axis in Hereford heifers. *Reprod. Domest. Anim.* 00, 1–7. doi:10.1111/rda.13190

Guggeri, D., Meikle, A., Carriquiry, M., Montossi, F., De Barbieri, I., Viñoles, C., 2014. Effect of different management systems on growth, endocrine parameters and puberty in Hereford female calves grazing Campos grassland. *Livest. Sci.* 167, 455–462. doi:10.1016/j.livsci.2014.06.026

Scaramuzzi, R., Baird, D., Campbell, B., Driancourt, M., Dupont, J., Fortune, J., Gilchrist, R., Martin, G., McNatty, K., McNeilly, A., Monget, P., Monniaux, D., Driancourt, M.-A., Viñoles, C., Weeb, R., 2011. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 23, 444–467. doi:10.1071/RD09161

5. Uso del recuento folicular a campo. Impacto del recuento de folículos antrales sobre la fertilidad de vaquillonas para carne

Fernando Cuhna¹, Guillermo de Nava², Rodrigo Santa Cruz³, Carolina Viñoles⁴

Trabajo presentado en forma oral en las XLIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, 2016.

Introducción

El recuento de folículos antrales (RFA) está asociado con la fertilidad (Evans *et al.*, 2012). Vacas lecheras con bajo RFA tienen una menor performance reproductiva, expresada por un incremento en los días entre el parto y el primer servicio y entre el parto y la concepción (Martinez *et al.*, 2016). Investigaciones sobre el RFA y fertilidad en ganado de carne son muy escasas en el mundo. Estudios en ésta temática podrían revelar asociaciones con importantes implicancias en la selección de vaquillonas de reposición en los rodeos de cría. En vaquillonas para carne, el RFA está relacionado con el momento de la concepción, aspecto relevante en la productividad y longevidad de las vacas (Cushman *et al.*, 2013). Otro aspecto importante es que ésta herramienta se ha utilizado para seleccionar vaquillonas que son servidas por primera vez a los 14 meses de edad, en sistemas de producción intensivos. En este trabajo nos planteamos la hipótesis de que el RFA está relacionado con el comportamiento reproductivo en el primer servicio con 24 meses de vaquillonas de razas carniceras manejadas en las condiciones de explotación de Uruguay, y que esta información podría utilizarse para rechazar vaquillonas antes del servicio y mejorar el desempeño reproductivo del rodeo de cría.

Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en un predio comercial, establecimiento "Las Grutas", ubicado al este del departamento de Paysandú, Uruguay. Se utilizaron 354 vaquillonas nacidas en primavera 2012, razas Aberdeen Angus, Hereford y sus cruza. En setiembre de 2014 se realizaron mediciones ecográficas al total de las vaquillonas (ecografo Aloka 500, sonda 3,5 MHz, Aloka, Japón) obteniendo información sobre porcentaje de grasa intramuscular (% IMF), área de ojo de bife (AOB, cm²), espesor de grasa subcutánea (EGS, mm) y espesor de la grasa en la cadera (P8 mm). Se determinó la altura de las vaquillonas a nivel del anca (cm) y la condición corporal (escala 1 a 8; Vizcarra *et al.*, 1986). A fines de setiembre todas las vaquillonas se sometieron a ecografía transrectal (AGROSCAN AL, ALR 575, sonda lineal rectal de 5 / 7,5 MHz - 60 mm) que incluía un examen del tracto reproductivo (score 1 (inmaduro) a 5 (ciclando), Anderson *et al.*, 1991), el recuento de folículos antrales (mayores a 2 mm) en ambos ovarios, el registro de la presencia de CL y del tamaño de los folículos dominantes. El 21 de octubre del 2014 se registró el peso vivo y se realizó palpación rectal, y las vaquillonas que presentaban score del tracto reproductivo ≥ 3 (n = 271), fueron sincronizadas para la primera inseminación a tiempo fijo (IATF¹).

¹ DCV, profesión liberal

² DMTV, MSc., profesión liberal

³ DCV, Polo Agroforestal, UdelaR, EEER, km 408, Ruta 26, Cerro Largo

⁴ DMTV, MSc., PhD., Programa Nacional de Investigación Producción Carne y Lana, INIA Tacuarembó. Polo Agroforestal, UdelaR, EEER, km 408, Ruta 26, Cerro Largo.

El día 24 de noviembre, se realizó palpación rectal de las 83 vaquillonas que no entraron en la IATF¹, y aquellas que habían alcanzado un score del tracto reproductivo ≥ 3 (n = 61), entraron a una segunda sincronización (IATF²). El protocolo de sincronización de ambas IATFs comenzó (Día 0, am) con la colocación de un dispositivo intravaginal de 750 mg de progesterona (Pro Ciclar, Zoovet®) y 1,5 mg de benzoato de estradiol (Benzoato de estradiol, Zoovet®) vía intramuscular. El día 7 (pm) se retiró el dispositivo intravaginal y se le administraron 150 µg intramuscular de prostaglandina sintética (D+Cloprostenol 0,0075 %, Zoovet®). El día 9 (am, 36 hs de retirado el dispositivo) las vaquillonas en celo fueron inseminadas (pm), y las no detectadas en celo recibieron 8,4 µg de un análogo de GnRH (acetato de buserelina 0,0042 mg, Nanokem®) por vía intramuscular. En la mañana del día 10, a las 12 - 16 h de inyectada la GnRH se inseminaron el resto de las vaquillonas. Se comenzó el repaso con toros a los 15 días de cada IATF, teniendo el servicio una duración total de 94 días (inicio del servicio Día 0 de la IATF¹). Se realizaron ecografías seriadas con el fin de determinar el momento de la concepción y la tasa de preñez. El semen utilizado era de procedencia nacional, en la IATF¹ se utilizó solo el toro "Wanaka 12" y en la IATF² solo el toro "Tamarindo", ambos fueron elegidos por destacarse en otros programas de IATF por su capacidad fecundante. Las vaquillonas de ambas IATFs fueron divi-

didadas de acuerdo al RFA realizado a fines de setiembre, en 3 clases foliculares (baja, media y alta), de forma tal que la población quedara dividida en tres tercios iguales. Las variables continuas fueron analizadas por análisis de varianza utilizando un modelo lineal generalizado (GLM) y las discretas por un modelo lineal generalizado mixto (Genmode) en el Statistical Analysis Software (SAS 9.4, SAS Institute Inc, Cary, Carolina del Norte, EEUU, 2002). Los modelos evaluaron las variables fijas IATF (1 y 2), clase de RFA (baja, media y alta) y la interacción entre ellas. Los valores fueron considerados significativos si $P < 0,05$ y tendencia $P < 0,10$.

Resultados

Las vaquillonas inseminadas en la IATF¹, fueron más pesadas, altas y tenían mayor deposición de músculo y grasa que las inseminadas a la IATF² (Cuadro 4). No se observaron diferencias en el RFA promedio general (Cuadro 4), ni dentro de las clases baja ($9,2 \pm 0,3$ folículos vs $9,8 \pm 0,8$), media ($14,4 \pm 0,3$ folículos vs $14,1 \pm 0,7$ folículos) y alta ($24,4 \pm 0,4$ folículos vs $24,6 \pm 0,7$ folículos), entre los grupos de IATF 1 y 2, respectivamente. Las clases foliculares baja, media y alta difirieron estadísticamente ($P < 0,001$) para cada grupo de IATF. Las vaquillonas del grupo IATF¹ se preñaron antes, y el porcentaje de preñez final fue superior que las del grupo IATF² (Cuadro 4).

Cuadro 4. Recuento de folículos antrales (RFA), peso vivo (kg), altura (cm), área de ojo de bife (AOB, cm²) y espesor de grasa subcutánea (EGS, cm), momento de la concepción y preñez final de vaquillonas Angus, Hereford y cruzas inseminadas a tiempo fijo en la primera (IATF¹) o segunda (IATF²) oportunidad (Media \pm EE)

	IATF ¹	IATF ²	Valor P
n	271	61	
RFA	15,6 \pm 0,4	16,7 \pm 0,9	0,3
Peso (kg)	322 \pm 1,8	298 \pm 3,8	0,001
Altura (cm)	115,2 \pm 0,2	114,1 \pm 0,4	0,05
AOB (cm)	37,7 \pm 0,3	34,1 \pm 0,6	0,001
EGS (cm)	1,95 \pm 0,02	1,73 \pm 0,05	0,001
Concepción (días)	52,5 \pm 1,4	70,2 \pm 3,0	0,001
Preñez Final (n, %)	268 (98,9)	53 (86,9)	0,001

Las vaquillonas del grupo IATF¹ con mayor RFA fueron más pesadas y altas que las de RFA bajo y medio (Cuadro 5). Las vaquillonas de RFA bajo tendieron ($P=0,07$) a tener un mayor AOB que las de RFA medio, pero similar a las de RFA alto (Cuadro 5). Las vaquillonas de RFA bajo tendieron a tener un mayor espesor de grasa sub-cutánea respecto a las de RFA medio, siendo intermedios los valores para las de RFA alto (Cuadro 5). Las vaquillonas de RFA alto tuvieron una mayor condición corporal respecto a las de RFA medio y tendieron a tener mayor condición corporal respecto a las de RFA bajo ($P=0,08$). No se observaron diferencias en el P8 entre vaquillonas de las diferentes

clases de RFA ($2,28 \pm 0,07$ cm; $P > 0,05$). En el grupo de vaquillonas inseminadas en la IATF², no se observó ninguna asociación entre la clase de RFA y las características que describen el crecimiento y desarrollo de los animales. La preñez al final del período de servicio de 94 días de duración fue similar entre clases de RFA para la IATF¹ e IATF² (baja: 95/95 (100%) y 16/17 (94%); media: 90/91 (99%) y 20/22 (91%); alta: 83/85 (98%) y 17/22 (77%); respectivamente). Sin embargo, para ambos grupos de vaquillonas (IATF¹ (Cuadro 5) e IATF²) las de RFA alto concibieron antes ($58,1 \pm 5,0$ días) respecto a las de RFA bajo ($75,7 \pm 5,0$ días) y medio ($78,1 \pm 2,8$ días; $P < 0,01$).

Cuadro 5. Vaquillonas de la primera inseminación a tiempo fijo ($n=271$), clasificadas según el recuento de folículos antrales (RFA) en bajo, medio y alto, y su relación con el peso vivo (kg), altura de anca (cm), área de ojo de bife (AOB, cm^2), espesor de grasa sub-cutánea (EGS, cm), condición corporal (CC, unidades) y momento de la concepción (días) (Media \pm EE).

Clase	Bajo	Medio	Alto
RFA	$9,2 \pm 0,3^a$	$14,4 \pm 0,3^b$	$24,4 \pm 0,4^c$
Peso (kg)	$318,4 \pm 3,1^a$	$317,7 \pm 3,2^a$	$330,9 \pm 3,3^b$
Altura (cm)	$114,6 \pm 0,4^a$	$114,9 \pm 0,4^a$	$116,1 \pm 0,4^b$
AOB (cm^2)	$38,2 \pm 0,5$	$36,9 \pm 0,5$	$37,8 \pm 0,5$
EGS (cm)	$2,02 \pm 0,04$	$1,90 \pm 0,04$	$1,92 \pm 0,05$
CC (unidades)	$4,93 \pm 0,06^{ab}$	$4,91 \pm 0,06^b$	$5,07 \pm 0,06^a$
Concepción (días)	$55,7 \pm 2,4^a$	$52,6 \pm 2,4^a$	$48,7 \pm 2,5^b$

Letras diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas

Discusión

Los resultados de éste trabajo sugieren que el RFA, realizado en vaquillonas para carne un mes antes del inicio del período de servicio (IATF¹) con 24 meses de edad, permitiría seleccionar a las que conciben antes, de acuerdo con trabajos previos realizados en vaquillonas para leche servidas con 14 meses de edad (Evans *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2016). Sin embargo, el RFA en forma aislada no permitió discriminar a los animales pre-púberes de los peri y pos-púberes, objetivo que si se logró aplicando el score del tracto reproductivo, que evalúa estruc-

turas ováricas y uterinas (Anderson *et al.*, 1991). Las vaquillonas que ingresaron en la IATF¹, tenían parámetros de crecimiento y desarrollo compatibles con una pubertad más temprana que las del grupo IATF². Estas diferencias probablemente estén asociadas con la edad, el patrón de crecimiento pre-destete y el peso al destete de los grupos de vaquillonas, que redundó en una preñez más temprana y un mayor porcentaje de preñez, como ha sido descrito anteriormente (Roberts *et al.*, 2017). Solamente en las vaquillonas del grupo IATF¹ hubo una asociación positiva del RFA con altura y peso vivo, en coincidencia con lo reportado por otros

autores (Eborn *et al.*, 2013), pero la misma no fue lineal. La deposición de músculo y grasa, que estuvo asociada con la madurez y el resultado reproductivo en los grupos de IATF, no tuvo una asociación clara con las clases de RFA en las vaquillonas del grupo IATF¹. Un trabajo reciente sugiere que el parámetro que tiene mayor correlación genética con la preñez de la vaquillona es el peso pre-destete directo, aunque también describe correlaciones bajas de naturaleza positiva con el AOB y el EGS (Boldt *et al.*, 2018). En éste sentido, las vaquillonas con alto RFA tuvieron una mayor condición corporal, aunque nuevamente ésta relación no fue lineal. En las vaquillonas pre-púberes del grupo IATF², no observamos ninguna asociación de los parámetros que describen crecimiento y desarrollo con el RFA, en forma opuesta a resultados previos obtenidos por éste equipo de trabajo (Santa Cruz *et al.*, 2018). Las diferencias pueden estar asociadas con la raza (Braford vs Angus, Hereford y sus cruza), el plano nutricional (alto vs bajo) y la edad al primer servicio (14 vs 24 meses) en ambos experimentos. Concluimos que en las condiciones en que fue realizado éste trabajo, el RFA realizado una sola vez por ultrasonografía un mes previo al inicio del período de servicios, permitiría seleccionar las vaquillonas más fértiles como reemplazos. Los parámetros que describen el crecimiento y desarrollo de las vaquillonas, estuvieron claramente asociados con el grupo de IATF, pero el RFA en forma aislada, no permitió discriminar entre vaquillonas pre vs peri y pos-púberes. Nuestros resultados refuerzan la relevancia de realizar score del tracto reproductivo para seleccionar las vaquillonas que entran en los programas de IATF para asegurar el éxito del mismo.

Referencias bibliográficas

- Anderson, K., LeFever, D., Brinks, J., Odder, K.**, 1991. The use of reproductive tract scoring in beef heifers. *Agri Pract.* 12, 19–26.
- Boldt, R.J., Speidel, S.E., Thomas, M.G., Enns, R.M.**, 2018. Genetic parameters for fertility and production traits in Red Angus cattle. *J. Anim. Sci.* 96, 4100–4111. doi:10.1093/jas/sky294
- Cushman, R.A., Kill, L.K., Funston, R.N., Mousel, E.M., Perry, G.A.**, 2013. Heifer calving date positively influences calf weaning weights through six parturitions. *J. Anim. Sci.* 91, 4486–4491. doi:10.2527/jas.2013-6465
- Eborn, D., Cushman, R., Echternkamp, S.**, 2013. Effect of postweaning diet on ovarian development and fertility in replacement beef heifers. *J. Anim. Sci.* 91, 4168–4179.
- Evans, A.C., O., Mossa, F., Walsh, S.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Ireland, J.J.**, 2012. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 31–37. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x
- Martinez, M.F., Sanderson, N., Quirke, L.D., Lawrence, S.B., Juengel, J.L.**, 2016. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. *Theriogenology* 85, 466–475. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.09.026
- Roberts, A.J., Gomes Da Silva, A., Summers, A.F., Geary, T.W., Funston, R.N.**, 2017. Developmental and reproductive characteristics of beef heifers classified by pubertal status at time of first breeding. *J. Anim. Sci.* 95, 5629–5636. doi:10.2527/jas2017.1873
- Vizcarra, J.A., Ibañez, W., Orcasberro, R.**, 1986. Repetibilidad y reproductibilidad de dos escalas para estimar la condición corporal de vacas Hereford. *Investig. Agronómicas* 7, 45–47.

6. Programa recuento folicular automático. Detección de folículos en videos de ultrasonido de ovarios bovinos

Alvaro Gómez¹, Guillermo Carbajal², Magdalena Fuentes³, Carolina Viñoles⁴

Trabajo presentado en XXI IberoAmerican Congress on Pattern Recognition (CIARP 2016), Lima, Perú, 2016.

Introducción

En los últimos años, ha habido un creciente interés en investigaciones relacionadas con el recuento de folículos antrales (RFA) y su influencia en la capacidad reproductiva del ganado, así como su aplicación en biotecnologías asociadas a la reproducción (Ireland *et al.*, 2011; Morotti *et al.*, 2015). El RFA es sumamente variable en diferentes especies, pero en ganado, existe una alta repetibilidad en el mismo individuo, independientemente de raza, edad, temporada de cría, lactancia o condiciones de preñez (Burns *et al.*, 2005). Además, el RFA es consistente a lo largo del ciclo estral en vacas individuales; por lo tanto, un único examen de ultrasonido de rutina es suficiente para identificar hembras con RFA bajo, medio o alto (Martinez *et al.*, 2016). Más interesante aún, existen estudios que muestran que vacas con bajo RFA tienen baja fertilidad (Cushman *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2016).

Para contar los folículos antrales, los veterinarios usualmente realizan una ecografía transrectal, durante la cual, luego de localizar la región del ovario, se lo escanea con un movimiento de rotación que lo recorre de polo a polo. El procedimiento debe realizarse en unos pocos segundos y requiere de entrenamiento por parte de los operadores, para poder detectar y contar los folículos de

manera confiable. Los resultados son exactos cuando el ovario tiene unos pocos folículos grandes, pero la exactitud baja cuando el número de folículos en el ovario es grande y/o los folículos son pequeños.

El conteo automático del número de folículos antrales en el ovario permanece como un desafío abierto para los métodos del estado del arte (Hiremath y Tegnoor, 2013; Potočnik *et al.*, 2012). Los bordes de los folículos pequeños son débiles e irregulares debido a las características de las imágenes de ultrasonido. La presencia de estructuras similares a los folículos, como los vasos sanguíneos, hacen que el problema sea aún más difícil. Sin embargo, contar el número de folículos tiene la ventaja que no requiere una segmentación precisa de los folículos. El problema ha sido abordado anteriormente de diferentes maneras, con imágenes de ultrasonido 2D y 3D, pero no hay hasta el momento resultados concluyentes a nivel académico o en desarrollos comerciales.

Se ha descrito un método para detectar automáticamente el ovario y los folículos en ultrasonido 3D (Chen *et al.*, 2009). El enfoque propone un marco probabilístico para estimar el tamaño y la ubicación de cada folículo en el ovario, mediante la fusión de información de contexto, tanto global como local.

¹ Ing., MSc., Grado 3 Departamento de Procesamiento de Señales, Instituto Ingeniería Eléctrica, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República.

² Ing., MSc., Grado 2 Departamento de Procesamiento de Señales, Instituto Ingeniería Eléctrica, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República.

³ Ing., Grado 1 Departamento de Procesamiento de Señales, Instituto Ingeniería Eléctrica, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República.

⁴ DMTV, MSc., PhD., Programa Nacional de Investigación Producción Carne y Lana, INIA Tacuarembó. Polo Agroforestal, UdelaR, EEER, km 408, Ruta 26, Cerro Largo.

El software comercial SonoAVC que se encuentra integrado al ecógrafo Voluson E8 (GE Medical Systems) realiza una segmentación semiautomática de los folículos en imágenes de ultrasonido 3D utilizando un algoritmo basado en morfología matemática (Raine-Fenning *et al.*, 2008).

Los métodos que detectan los folículos en 3D son probablemente los más exitosos. La información adicional presente en ultrasonido 3D puede ser utilizada efectivamente para discernir entre folículos y otras falsas detecciones (Potočnik *et al.*, 2012). Sin embargo, veterinarios de nuestro grupo de investigación, en concordancia con trabajos previos (Potočnik *et al.*, 2012), prefieren escaneos 2D porque las sondas les resultan más fácil de manipular y las imágenes de interpretar. Además, los ecógrafos 3D son aún de difícil acceso para los veterinarios de países en desarrollo. Por esta razón, nuestro objetivo es investigar si es posible contar el número de folículos utilizando videos de ultrasonido 2D.

En lo que refiere a la detección de folículos en una única imagen de ultrasonido, un grupo introdujo varios métodos basados en el crecimiento de regiones (Potočnik y Zazula, 2002a, 2000). Otro grupo propuso varios algoritmos basados en un esquema de extracción de características y clasificación (Hiremath y Tegnoor, 2013).

Para contar todos los folículos del ovario, se necesita más de una imagen. Una de las posibilidades es segmentar las imágenes cuadro a cuadro y luego agrupar las detecciones correspondientes a un mismo folículo como una única detección. Se ha descrito un método que trabaja con una secuencia temporal de imágenes de ultrasonido (Potočnik y Zazula, 2002b) que fue posteriormente mejorado (Potočnik y Zazula, 2003). Los bordes

de los folículos detectados son seguidos por una combinación de tres filtros de Kalman mutuamente dependientes.

Lamentablemente, no existe una base de datos pública de imágenes de ultrasonido (2D o 3D) de ovarios que permita una comparación objetiva entre los diferentes métodos.

Conjunto de datos

A los efectos de desarrollar y evaluar el abordaje propuesto, se confeccionaron dos fantomas (elemento utilizado para el calibrado de equipos de imagen y que contiene, en su interior, elementos de características similares a los del organismo) con nueve ovarios cada uno sumergidos en gelatina. Los ovarios se recogieron de un frigorífico, y se acondicionaron eliminando restos de tejido. Cada fantoma se construyó colocando los ovarios en una caja rellena de gelatina, a una altura aproximada de 1 cm.

Para cada ovario, un experto realizó 3 adquisiciones de ultrasonido con la sonda transrectal. Las adquisiciones se realizaron haciendo un giro de la sonda sobre su eje. Los videos fueron adquiridos a 30 cuadros por segundo, a una resolución de 640x480, siguiendo el siguiente criterio: (a) barrido de derecha a izquierda, de polo a polo del ovario (b) barrido de izquierda a derecha, de polo a polo del ovario (c) barrido de ida y vuelta, de polo a polo del ovario, mientras el experto realiza un conteo de folículos.

Luego de escanearlos con ultrasonido, los fantomas fueron desarmados y los ovarios disecados. Para cada ovario, todos los folículos y cuerpos lúteos fueron medidos. Los tamaños de los folículos variaron en el rango de 2 a 20 mm. La Figura 14 muestra uno de los fantomas y el procedimiento de adquisición de ultrasonido.

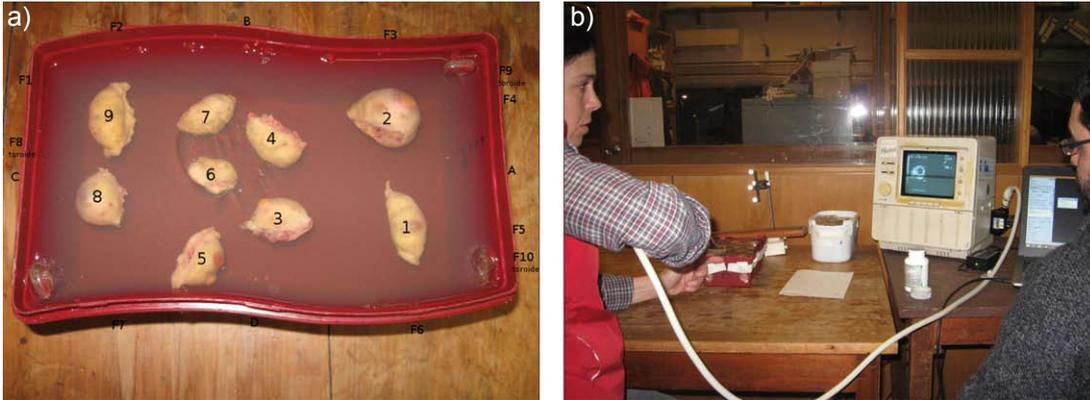


Figura 14. Fantoma con ovarios inmersos en gelatina (a) y el escaneo con la sonda rígida (b).

Procesamiento de señales para la detección de folículos

Detección de regiones candidatas en cada cuadro

El primer paso consiste en detectar automáticamente, en cada cuadro de video, aquellas regiones que parecen ser folículos. Los folículos son estructuras aproximadamente esféricas, rellenas con líquido. La ecogenicidad en las paredes es alta, mientras que el fluido interior es prácticamente anecoico. Se observan típicamente en ultrasonido como círculos

oscuros con bordes más intensos. Una cascada de clasificadores (Viola y Jones, 2001) de tipo boosting, que utiliza como características patrones locales binarios (en inglés Local Binary Pattern), es una eficaz y eficiente alternativa para detectar este tipo de estructuras. El clasificador fue entrenado con un conjunto de regiones pertenecientes a folículos, y con regiones negativas. Las regiones fueron escaladas a un tamaño de 24 x 24 píxeles, o equivalentemente 2,4 x 2,4 mm, de acuerdo a la resolución del video utilizado. La figura 15 muestra un ejemplo de una región detectada en un cuadro en particular.

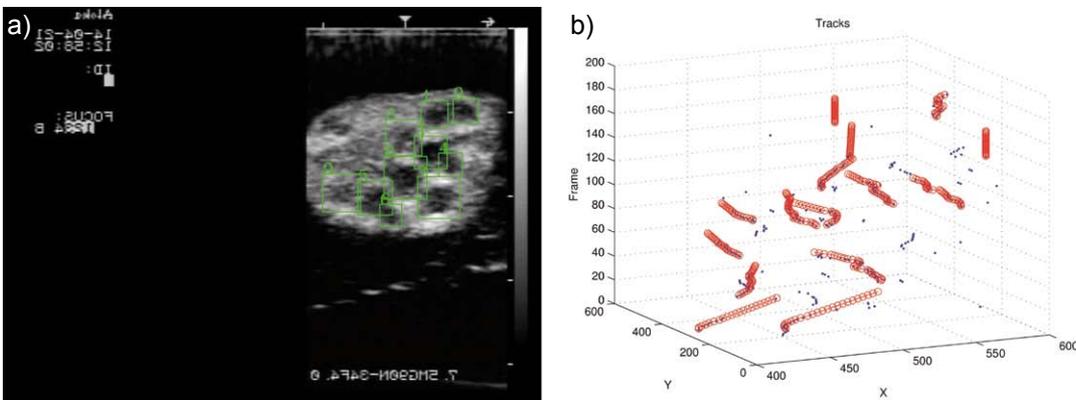


Figura 15. Regiones que se parecen a folículos son detectadas (a). Para imponer coherencia temporal, las detecciones son seguidas utilizando múltiples filtros de Kalman (b).

Coherencia temporal mediante seguimiento múltiple

Si bien el movimiento realizado durante el escaneo del ovario es esencialmente una rotación, pueden existir también pequeñas traslaciones. Éstas traslaciones pueden ser involuntarias (pequeños movimientos del operador o el movimiento del animal durante el procedimiento, por ejemplo) o planificadas, como es el caso en que el ovario es más ancho que el espacio cubierto por la sonda de ultrasonido. En cualquier caso, si estos movimientos no son muy bruscos, el seguimiento puede lidiar con ellos y separar adecuadamente las detecciones en tracks coherentes.

A los efectos de imponer coherencia temporal, las detecciones son seguidas a lo largo de los cuadros de video, utilizando múltiples filtros de Kalman (Kalman, 1960) que asumen aceleración constante. Las detecciones de cada cuadro son asignadas a los tracks activos utilizando el algoritmo húngaro (Kuhn, 1955) usando como matriz de costo la distancia entre las posiciones predichas para cada track y las detecciones. Para cada cuadro, las detecciones del clasificador son asignadas a los tracks activos de acuerdo a la distancia entre las detecciones y las posiciones predichas por los tracks. Cuando las detecciones no son asignadas a ningún track activo, un nuevo track es creado. La figura

15b muestra un ejemplo de los tracks detectados.

Identificación de la región del ovario

En los fantasmas, el ovario se encuentra rodeado de gelatina y esto, en cierta forma, facilita la identificación de la región del ovario. *In vivo*, el ovario es rodeado por otros tejidos y la superficie del mismo puede no ser fácilmente discernible. Algunas estructuras, que se ven en el ultrasonido similares a los folículos, pueden incluso generar detecciones espurias. De acuerdo a veterinarios familiarizados con este tipo de procedimientos, la superficie del ovario es a menudo difícil de identificar y la región del ovario es habitualmente reconocida por el agrupamiento de folículos los cuales son más fácilmente identificable en ultrasonido que la superficie del ovario. Con esto en mente, el abordaje en este trabajo es identificar la región del ovario como el agrupamiento de tracks detectados más importante. Para agrupar los tracks, se construye un mapa de probabilidad mediante la convolución de la posición de los tracks (pesadas por el largo de track) con un kernel gaussiano. La región del ovario es detectada como el modo principal del mapa de probabilidad, calculado usando el algoritmo Mean Shift (Cheng, 1995), considerando un tamaño de ovario típico. La figura 16 muestra la región identificada en uno de los ovarios.

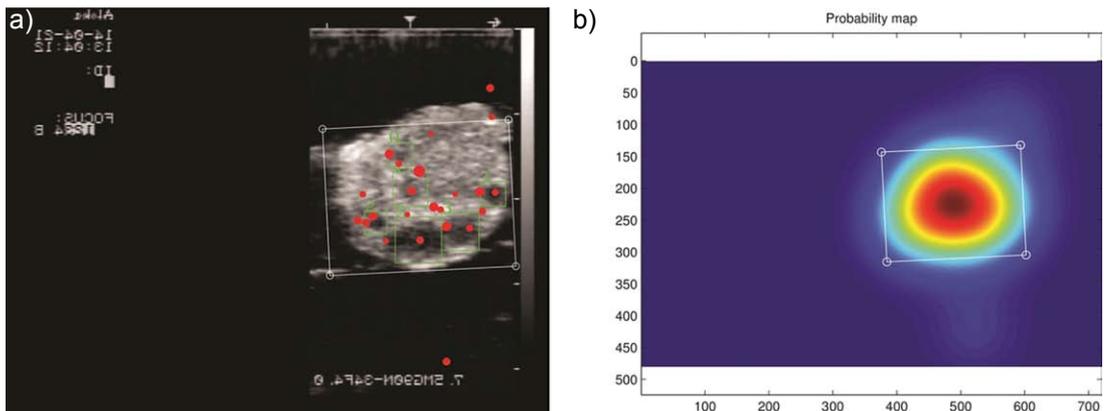


Figura 16. Identificación del ovario como el cluster principal de tracks detectados. El rectángulo blanco en a y b bordea la zona considerada.

Identificación de folículos y medida

Para considerar un track detectado como folículo, el track debe haber estado activo al menos un número mínimo de cuadros. Esto permite diferenciar un folículo que es consistentemente detectado a lo largo de varios cuadros, de tracks originados por detecciones espurias de la cascada de clasificadores. Con este enfoque, es necesario determinar como punto de funcionamiento, el mínimo número de cuadros por encima del cual se considera un track como una detección de folículo. Dicho umbral se puede seleccionar como el que da los mejores resultados, en el sentido de menor error cuadrático medio, contra el conteo obtenido producto de la disección.

Una vez que el track es considerado un folículo, el diámetro del folículo se puede estimar como la detección más grande del track, que se corresponde con el cuadro en el cual el plano de ultrasonido corta al folículo (aproximadamente una esfera) en su círculo máximo.

Experimentos y Resultados

Los fantasmas fueron utilizados para evaluar este enfoque. Como se mencionó en la sección "conjunto de datos", para cada ovario se realizaron dos escaneos con ultrasonido (derecha a izquierda e izquierda a derecha), donde cada ovario es escaneado mediante un movimiento de rotación que lo cubre de

extremo a extremo. Para determinar el punto de funcionamiento (el umbral para el mínimo número de cuadros para considerar una detección de folículo), se realizaron 50 repeticiones de validación cruzada en 6-folds, sobre el conjunto de adquisiciones derecha a izquierda. El cuadro 6 presenta los resultados de la validación cruzada.

Se observa que el punto de funcionamiento se concentra alrededor de un largo mínimo de track de 17 cuadros (Figura 17b). Como los videos son de 30 cuadros por segundo, esto quiere decir que los tracks tienen que estar activos por más de medio segundo para ser considerados como folículo. Alrededor de este punto de funcionamiento, los resultados contrastados contra la disección pueden ser considerados comparables al experto, con un menor factor de correlación pero algo mejor centrados (Figura 17a y cuadro 6). Es conocido por los expertos que la exactitud de la cuenta cae cuando el número de folículos en el ovario aumenta (se tiende a subestimar la cuenta). Los resultados en este conjunto de datos son consistentes con este hecho. La cuenta brindada por el experto es muy cercana a la obtenida mediante disección en ovarios con pocos folículos (menos de 18 en este conjunto de datos) mientras que se aleja al aumentar la cantidad de folículos. El método automático también subestima la cuenta en ovarios con muchos folículos pero el resultado se aproxima más a la disección en estos casos.

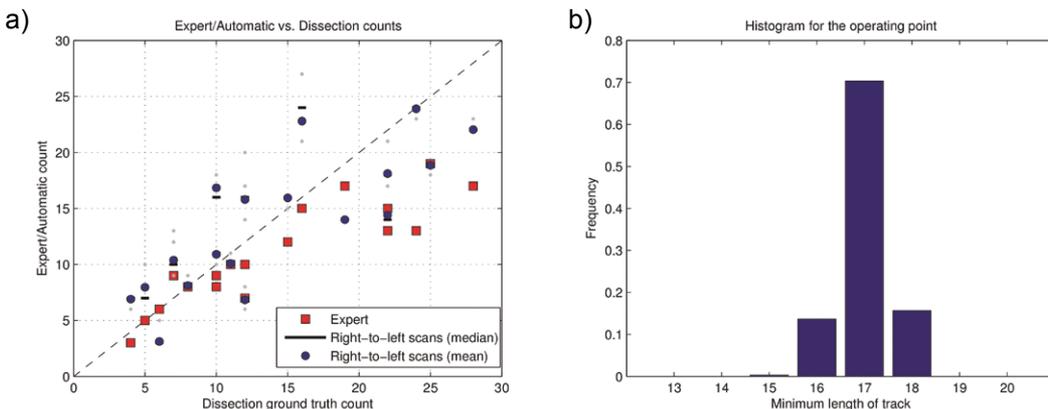


Figura 17. Resultados de las 50 repeticiones de validación cruzada en 6-folds para el conjunto derecha-a-izquierda

Cuadro 6. Resultados alrededor del punto de funcionamiento calculado para los escaneos derecha a izquierda e izquierda a derecha.

Resultados de la cuenta alrededor del punto de operación
(longitud mínima del track entre 15 y 19 cuadros)

	Experto	Escaneado de derecha a izquierda					Escaneado de izquierda a derecha				
		15	16	17	18	19	15	16	17	18	19
Correlación de Pearson	0,90	0,82	0,83	0,85	0,85	0,86	0,81	0,78	0,81	0,84	0,85
Sobreestimación máxima	2	11	8	6	5	3	9	8	8	5	3
Subestimación mínima	-11	-5	-5	-6	-8	-11	-8	-9	-9	-9	-9
Promedio de diferencias	-3,33	2,22	0,78	-0,56	-1,33	-2,78	1,22	-0,33	-1,50	-2,50	-2,50
Mediana de diferencias	-2,00	1,50	0,50	0,00	-0,50	-3,00	1,00	-0,50	-1,50	-2,50	-2,50
Diferencias estandar	3,93	4,37	4,18	3,97	3,93	-4,05	4,44	4,70	4,37	4,10	4,10

Conclusiones

Se presentó un algoritmo para resolver el problema de detectar folículos antrales presentes en ovarios de vacas, utilizando videos de ultrasonido. El método de conteo de folículos explorado trabaja directamente sobre los videos de ultrasonido generados en el escaneo de ovarios, con la única restricción que el escaneo debe realizarse en una única pasada que cubra el ovario de extremo a extremo. El bajo requerimiento computacional del procesamiento posibilita la obtención de los resultados inmediatamente después del escaneo. El método permite además estimar el tamaño de los folículos detectados.

A pesar que el número de fantasmas con los que se realizaron los experimentos no es muy grande, los resultados se pueden considerar promisorios, con conteos comparables a un experto pero en un ambiente muy controlado.

El pasaje a una evaluación en campo requerirá con seguridad de un robustecimiento de los distintos pasos del procedimiento. El trabajo debería incluir por ejemplo, la evaluación de otras estrategias para identificar los folículos verdaderos de las detecciones, así como formas alternativas de identificar la región del ovario en el video *in vivo*. Además, un método para detectar el cuerpo lúteo en el ovario puede ayudar a diferenciar las cavidades de cuerpo lúteo de folículos reales.

Referencias bibliográficas

- Burns, D., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J., Knight, P., Ireland, J.**, 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-Stimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.* 73, 54–62. doi:10.1095/biolreprod.104.036277.
- Chen, T., Zhang, W., Good, S., Zhou, K.S., Comaniciu, D.**, 2009. Automatic ovarian follicle quantification from 3d ultrasound data using global/local context with database guided segmentation., in: *Computer Vision, 2009 IEEE 12th International Conference.* p. 795–802.
- Cheng, Y.**, 1995. Mean shift, mode seeking, and clustering., in: *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions.* p. 17(8):790–799.
- Cushman, R.A., Allan, M.F., Kuehn, L.A., Snelling, W.M., Cupp, A.S., Freetly, H.C.**, 2009. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *J. Anim. Sci.* 87, 1971–1980. doi:10.2527/jas.2008-1728.
- Hiremath, P.S., Tegnoor, J.R.**, 2013. Follicle Detection and Ovarian Classification in Digital Ultrasound Images of Ovaries. *InTech, Rijeka*, p. Ch. 7. doi:10.5772/56518.
- Ireland, J., Smith, G., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J., Ireland, J., Mossa, F., Lonergan, P., Evans, A.**, 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in. *Reprod. Fert. Dev.* 23, 1–14. doi:10.1071/RD10226.
- Kalman, R.E.**, 1960. A New Approach to Linear Filtering and Prediction Problems. *J. Basic Eng.* 82, 35. doi:10.1115/1.3662552.
- Kuhn, H.W.**, 1955. The Hungarian method for the assignment problem. *Nav. Res. Logist. Q.* 2, 83–97.
- Martinez, M.F., Sanderson, N., Quirke, L.D., Lawrence, S.B., Juengel, J.L.**, 2016. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. *Theriogenology* 85, 466–475. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.09.026.
- Morotti, F., Barreiros, T.R.R., Machado, F.Z., González, S.M., Marinho, L.S.R., Seneda, M.M.**, 2015. Is the number of antral follicles an interesting selection criterium for fertility in cattle ? 479–486.
- Potočnik, B., Cigale, B., Zazula, D.**, 2012. Computerized detection and recognition of follicles in ovarian ultrasound images: a review. *Med. Biol. Eng. Comput.* 50, 1201–1212.
- Potočnik, B., Zazula, D.**, 2003. Improved prediction-based ovarian follicle detection from a sequence of ultrasound images. *Comput. Methods Programs Biomed.* 70, 199–213.
- Potočnik, B., Zazula, D.**, 2002a. Automated analysis of a sequence of ovarian ultrasound images. Part I: segmentation of single 2D images. *Image Vis. Comput.* 20, 217–225.
- Potočnik, B., Zazula, D.**, 2002b. Automated analysis of a sequence of ovarian ultrasound images. Part II: prediction-based object recognition from a sequence of images. *Image Vis. Comput.* 20, 227–235.
- Potočnik, B., Zazula, D.**, 2000. Automated ovarian follicle segmentation using region growing, in: *Image and Signal Processing and Analysis, 2000. IWISPA 2000. Proceedings of the First International Workshop On.* pp. 157–162.

Raine-Fenning, N., Jayaprakasan, K., Clewes, J., Joergner, I., Bonaki, S.D., Chamberlain, S., Devlin, L., Priddle, H., Johnson, I., 2008. SonoAVC: a novel method of automatic volume calculation. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 31, 691–696.

Viola, P., Jones, M., 2001. Rapid object detection using a boosted cascade of simple features, in: *Computer Vision and Pattern Recognition, 2001. CVPR 2001. Proceedings of the 2001 IEEE Computer Society Conference On.* p. I-511.

7. Consideraciones finales

Este proyecto de investigación permitió ajustar aspectos prácticos como: 1) poner a punto el kit para medir las concentraciones de AMH en nuestro país, y confirmar que las concentraciones circulantes de ésta hormona permiten discriminar grupos de vaquillonas en diferentes clases de RFA (Artículo II); 2) que el RFA puede ser realizado en animales pre-púberes pos-destete, utilizando una sonda transrectal manipulada externamente (Artículos II, III y IV); 3) que el RFA > 2 mm a campo puede realizarse una sola vez, independientemente del momento del ciclo estral (Artículos III y IV); 4) que el dato de RFA aislado, no permite discriminar entre animales pre vs peri y pos-púberes, pero que junto al score del tracto reproductivo, permite seleccionar animales más fértiles para los programas de IATF (Artículo V); 5) que es factible desarrollar un programa que permita a campo contar y medir folículos ováricos a partir de videos de ultrasonido con resultados comparables a los de un técnico experto en ultrasonografía (Artículo VI).

Los aportes académicos de éste proyecto son: 1) en vaquillonas Braford pero no en Hereford al destete, observamos una asociación positiva del RFA con parámetros de crecimiento y desarrollo y negativa con la edad a la pubertad. En el ciclo estral pos-inseminación con 13-15 meses, observamos que las vaquillonas con menor RFA tienen menores concentraciones de progesterona y potencialmente menores chances de mantener la gestación (Artículo III); 2) en

vaquillonas Braford pos-destete, el RFA y las concentraciones de AMH pueden usarse indistintamente, para seleccionar vaquillonas más precoces (Artículo III); 3) a pesar de que el creep feeding se asocia con un crecimiento y desarrollo más acelerado, una pubertad más temprana y mayores concentraciones de progesterona al momento del reconocimiento materno de la preñez, no promueve cambios en el RFA en terneras al destete (IV); 4) en vaquillonas Hereford, Angus y sus cruza pre, peri y pos-púberes servidas con 24 meses, el RFA se asocia con un adelanto en el momento de la concepción. En las categorías peri y pos-púberes, el RFA se asoció con un mayor peso y altura, pero ésta relación no fue lineal y no se observó en las vaquillonas pre-púberes (Artículo V).

Basados en los resultados obtenidos en la secuencia de experimentos planteados en éste proyecto, describimos en la Figura 18 que existe una importante interacción entre los diferentes factores que afectan el crecimiento y desarrollo de las terneras (nutrición, raza, edad) y la aparición de la pubertad. El RFA en forma aislada, sin considerar parámetros de crecimiento y desarrollo, y el score del tracto reproductivo (STR), permite seleccionar vaquillonas que conciben antes, pero no mejora el porcentaje global de preñez. El uso de estas herramientas en forma conjunta (RFA al momento de realizar el STR), permitirá seleccionar reemplazos más longevos y productivos.

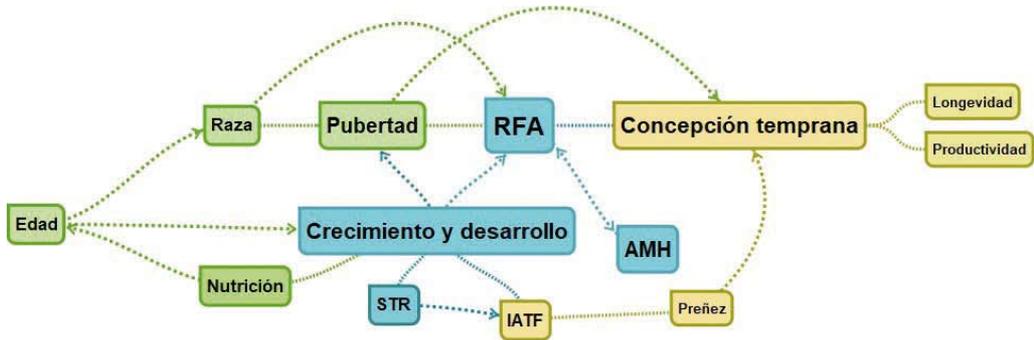


Figura 18. Relación de los diferentes factores que afectan el crecimiento y desarrollo de las vaquillonas, como son la nutrición, edad y raza, y determinan el momento de la aparición de la pubertad. El recuento de folículos antrales (RFA) en forma aislada, no permite discriminar entre animales pre, peri y pos-púberes, pero su asociación con el score del tracto reproductivo (STR) permite definir el ingreso de los animales en los programas de inseminación a tiempo fijo (IATF) que lograrán una concepción más temprana y mayor porcentaje de preñez. El uso combinado de estas herramientas (RFA al momento de realizar el STR) permite seleccionar reemplazos que tendrán mayor longevidad y productividad en el rodeo. La alta correlación observada entre RFA y AMH sugiere que ambas pueden ser utilizadas con el mismo objetivo.

INIA Dirección Nacional

Andes 1365, P. 12

Montevideo

Tel. 598 2902 0550

Fax 598 2902 3633

iniadn@dn.inia.org.uy

INIA La Estanzuela

Ruta 50, Km 11

Colonia

Tel. 598 4574 8000

Fax 598 4522 4061

iniale@le.inia.org.uy

INIA Las Brujas

Ruta 48, Km 10

Canelones

Tel. 598 2367 7641

Fax 598 2367 7609

inia_lb@lb.inia.org.uy

INIA Salto Grande

Camino al Terrible

Salto

Tel. 598 4733 5156

Fax 598 4732 9624

inia_sg@sg.inia.org.uy

INIA Tacuarembó

Ruta 5, Km 386

Tacuarembó

Tel. 598 4632 2407

Fax 598 4632 3969

iniatbo@tb.inia.org.uy

INIA Treinta y Tres

Ruta 8, Km 281

Treinta y Tres

Tel. 598 4452 2305

Fax 598 4452 5701

iniatt@tyt.inia.org.uy

www.inia.uy