



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

**CARRERA MEDICINA VETERINARIA**

**INFORME DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR  
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO  
VETERINARIO**

**MECANISMO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**TEMA:**

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE FSH (FOLLTROPIN®) EN LA  
PRODUCCIÓN DE EMBRIONES BOVINOS in vitro**

**AUTOR:**

**MENDOZA ZAMBRANO BRYAN FABIÁN**

**TUTOR:**

**MED.VET. FERNANDO JAVIER BRITO DONOSO, Mg.**

**CALCETA, FEBRERO 2024**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, BRYAN FABIÁN MENDOZA ZAMBRANO con cédula de ciudadanía 1314898774, declaro bajo juramento que el Trabajo de Integración Curricular titulado: **EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE FSH (FOLLTROPIN®) EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES BOVINOS *in vitro***, es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, concedo a favor de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos, conservando a nuestro favor todos los derechos patrimoniales de autor sobre la obra, en conformidad con el Artículo 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación.

---

**BRYAN FABIÁN MENDOZA ZAMBRANO**  
**CC: 1314898774**

## AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

BRYAN FABIAN MENDOZA ZAMBRANO con cédula de ciudadanía 1314898774, declaro bajo juramento que el Trabajo de Integración Curricular titulado **EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE FSH (FOLLTROPIN®) EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES BOVINOS *in vitro***, autorizo a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, la publicación en la biblioteca de la institución del Trabajo de Integración Curricular, cuyo contenido, ideas y criterio son de mi exclusiva responsabilidad y total autoría.

---

**BRYAN FABIÁN MENDOZA ZAMBRANO**  
**CC: 1314898774**

## **CERTIFICACIÓN DE TUTOR**

M.V Fernando Javier Brito Donoso, Mg certifica haber tutelado el Trabajo de Integración Curricular titulado: **EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE FSH (FOLLTROPIN®) EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES BOVINOS *in vitro***, que ha sido desarrollado por MENDOZA ZAMBRANO BRYAN FABIAN previo a la obtención del título de MÉDICO VETERINARIO de acuerdo con el **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

---

**MED.VET. FERNANDO JAVIER BRITO DONOSO, Mg**

**CC. 1309040937**

**TUTOR**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL**

Los suscritos integrantes del Tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el Trabajo de Integración Curricular titulado: **EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE FSH (FOLLTROPIN®) EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES BOVINOS *in vitro***, que ha sido desarrollado por BRYAN FABIAN MENDOZA ZAMBRANO, previo a la obtención del título de MÉDICO VETERINARIO, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

---

**DMVZ. MACÍAS ANDRADE JORGE IGNACIO, PhD.**  
**CC. 0910715200**  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

---

**MED.VET. ALCÍVAR MARTÍNEZ MARCO ANTONIO, Mg**  
**CC. 1310473770**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

**DMVZ. VERA MEJÍA RONALD RENÉ, PhD.**  
**CC. 1308932225**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

## **AGRADECIMIENTO**

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

A Dios por permitirme cumplir esta meta; A mis padres Fabián Mendoza y Patricia Zambrano por su apoyo incondicional, porque sin ellos no podría haber llegado tan lejos, a mis hermanas Gema y Fabiana por motivarme a seguir y apoyarme cuando más lo necesite; a mi abuela Antonia Reina, por darme el apoyo en aquellos momentos cuando sentía que ya no podía.

Al Médico Veterinario Andrés Vera Cedeño, por haber sido la persona mentora de esta investigación y por haberme ayudado y formado profesionalmente. De la misma manera al Médico Veterinario Víctor Ocampo por haber aportado en esta investigación y ser mi amigo.

Finalmente, a mi novia Milena por estar siempre apoyándome incondicionalmente y estar pendiente de que culmine con esta investigación:

Gracias totales porque sin ustedes no hubiese podido dar este pasó.

**BRYAN FABIÁN MENDOZA ZAMBRANO**

## **DEDICATORIA**

A mis padres por ser las personas que me han acompañado durante todo el trayecto de mi vida estudiantil, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad.

**BRYAN FABIÁN MENDOZA ZAMBRANO**

## CONTENIDO GENERAL

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN	iii
CERTIFICACIÓN DE TUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
CONTENIDO GENERAL	viii
CONTENIDO DE TABLAS	ix
CONTENIDO DE FIGURAS	ix
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	2
1.3. OBJETIVOS	3
1.2.1. OBJETIVO GENERAL	3
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
1.4. HIPÓTESIS	3
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN BOVINOS GYR	4
2.2. SELECCIÓN DE DONANTES	4
2.3. ASPIRACIÓN FOLICULAR	6
2.4. SELECCIÓN DE OVOCITOS	7
2.4.1. CLASIFICACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS OVOCITOS BOVINOS	8
2.5. DESARROLLO DE EMBRIONES	8
2.5.1. MADURACIÓN DE EMBRIONES	9
2.5.2. FERTILIZACIÓN DE EMBRIONES	9
2.5.3. CULTIVO DE EMBRIONES	10
2.5.4. CLASIFICACIÓN DE EMBRIONES	10
2.6. LA FSH EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES	11
2.6.1. FOLLTROPIN®	12



CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	14
3.1. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	14
3.2. CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS	14
3.3. DURACIÓN DEL TRABAJO	15
3.4. MÉTODOS Y TÉCNICAS	15
3.4.1. MÉTODOS	15
3.4.2. TÉCNICAS	15
3.5. FACTOR EN ESTUDIO	15
3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL	15
3.7. UNIDAD EXPERIMENTAL	15
3.8. VARIABLES	16
3.8.1. VARIABLE INDEPENDIENTE	16
3.8.2. VARIABLES DEPENDIENTES	16
3.9. MANEJO DEL EXPERIMENTO	16
3.9.1. SELECCIÓN DE LOS ANIMALES	16
3.9.2. CANTIDAD DE FOLÍCULOS ANTES Y DESPUÉS DE LA ESTIMULACIÓN	17
3.9.3. PRODUCCIÓN EN LABORATORIO	18
3.9.4. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN CANTIDAD 20	
3.9.5. ANÁLISIS COSTO BENEFICIO	20
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE FOLÍCULOS ESTIMULADOS BAJO EL EFECTO DE FOLLTROPIN®.	22
4.2. ESTABLECIMIENTO DE LA CANTIDAD OVOCITARIA CON Y SIN EL USO DE FOLLTROPIN®.	23
4.3. CÁLCULO DE LA CANTIDAD DE EMBRIONES PRODUCIDOS <i>in vitro</i> CON Y SIN LA APLICACIÓN DE FOLLTROPIN®.	24
4.4. COSTO BENEFICIO CON LA UTILIZACIÓN DE FOLLTROPIN® EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES <i>in vitro</i> .	26
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	27
5.1. CONCLUSIONES	27
5.2. RECOMENDACIONES	28

BIBLIOGRAFÍA	29
ANEXOS	38

### **CONTENIDO DE TABLAS**

<b>Tabla 4.2.</b> Número de Ovocitos viables	6
<b>Tabla 4.3.</b> Número de Embriones Viables.	7
<b>Tabla 4.4.</b> Análisis costo beneficio de las experimentaciones aplicadas	9

### **CONTENIDO DE FIGURAS**

<b>Figura 3.1.</b> Ubicación satelital del lugar de estudio	10
-------------------------------------------------------------	----

## RESUMEN

El presente estudio tuvo el objetivo de evaluar el efecto de la hormona foliculoestimulante (FSH-Folltropin®) sobre la producción de embriones *in vitro* en bovinos. Para su determinación se desplegó un diseño experimental Cross Over, en el cual se trataron 25 vacas cíclicas de razas cebuinas, con un peso promedio de 350 kg, condición corporal de 3 a 3,5 y una edad promedio de 36 a 50 meses, mismas que pasaron por ambos grupos experimentales (con y sin tratamiento), en complemento, se determinaron los parámetros de las variables de estudio mediante modelos lineales generalizados mixtos, con un nivel de significancia del 5 %. Los resultados muestran que la administración de FSH fue significativamente superior ( $p < 0,0001$ ) al tratamiento control, al presentar mayores cantidades de folículos estimulados, de ovocitos viables y embriones transferibles, además, el grupo de vacas tratadas con FSH, presentó una mejor rentabilidad a través de la relación costo/beneficio, dado que los ingresos por la producción de embriones superaron considerablemente a los costos asociados a la experimentación. Conforme a los resultados obtenidos, se observa que la aplicación del FSH para la estimulación ovárica, presenta resultados significativos y rentables financieramente, por lo cual se sugiere considerar el uso de este protocolo, para optimizar los resultados en programas de reproducción bovina.

## PALABRAS CLAVE

Reproducción bovina, protocolos, estimulación ovárica, calidad embrionaria, eficiencia reproductiva.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of follicle stimulating hormone (FSH-Folltropin®) on *in vitro* embryo production in cattle. For its determination, a Cross Over experimental design was deployed, in which 25 cyclic cows of zebu breeds were treated, with an average weight of 350 kg, body condition of 3 to 3.5 and an average age of 36 to 50 months, which went through both experimental groups (with and without treatment), in addition, the parameters of the study variables were determined by means of generalized linear mixed models, with a significance level of 5%. The results show that the administration of FSH was significantly superior ( $p < 0.0001$ ) to the control treatment, presenting greater quantities of stimulated follicles, viable oocytes and transferable embryos. In addition, the group of cows treated with FSH showed a better profitability through the cost/benefit ratio, since the income from the production of embryos considerably exceeded the costs associated with the experimentation. According to the results obtained, it can be observed that the implementation of FSH for ovarian stimulation presents significant and financially profitable results, so it is suggested to consider the use of this protocol to optimize the results in bovine reproduction programs.

## KEYWORDS

Bovine reproduction, protocols, ovarian stimulation, embryo quality, reproductive efficiency.

# **CAPÍTULO I. ANTECEDENTES**

## **1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

Según Marelli et al., (2013), la FSH (hormona folículo estimulante) es la responsable del crecimiento y la maduración folicular, así como del proceso de esteroidogénesis ovárica, cumpliendo una función relevante en el inicio de la formación de la cavidad antral. Así, los folículos preantrales en su etapa tardía, y los folículos antrales tempranos, expresan receptores para FSH.

Los mismos autores manifiestan que se ha demostrado que la FSH estimula la mitosis de las células de la granulosa, la formación del líquido folicular y la actividad esteroidogénica del folículo maduro (Marelli et al., 2013). Según Salgado et al., (2009). La FSH juega un rol fundamental en la producción masiva de embriones y se ha evidenciado que su uso mejora las técnicas de producción de embriones (in vitro e in vivo). A pesar de los avances en el desarrollo de protocolos hormonales de las últimas décadas, aún no es posible disminuir el efecto negativo generado por el manejo de los animales por causa de la vida media corta de la hormona FSH que varía de 5 a 12 horas aproximadamente (Mogollón y Burla, 2013).

La FSH requiere de múltiples aplicaciones para obtener una adecuada respuesta superovulatoria, lo que abre la posibilidad de la aplicación de eCG, que registra mayor estimulación ovárica con una sola administración (600 UI); no obstante, esta aplicación podría ser excesiva para animales de tipo bos indicus (Bó et al., 2020).

Por otra parte, el uso de dosis mínimas de gonadotropinas, lo cual implica una estimulación ovárica poco agresiva, se refleja en un inicio temprano de las divisiones embrionarias (Cantero, 2012); la estimulación ovárica prolongada provocada por los protocolos complementarios se traduce en folículos grandes no ovulados registrados hasta una semana post tratamiento (Gradela et al., 2002).

Estos factores de variaciones hormonales afectan la calidad embrionaria y provocan una disminución del porcentaje de embriones transferibles, lo que repercute en la reproducción de los hatos y comercialización de los embriones (Callejas et al., 2014).

Por lo mencionado anteriormente se plantea la siguiente interrogante:

¿La aplicación de FSH (Folltropin®) en vacas mejorará la calidad y cantidad de ovocitos, como también de blastocitos producidos *in vitro*?

## 1.2. JUSTIFICACIÓN

A lo largo de varios años, se ha dedicado esfuerzo a replicar artificialmente los eventos de la maduración y fertilización ovocitaria, así como el desarrollo embrionario temprano. Aunque inicialmente esto se limitaba a fines de investigación, en años recientes, se ha comenzado a emplear la hormona folículo estimulante (FSH) con objetivos comerciales, según señalan Mucci y colaboradores (2006).

En el ámbito de la producción de embriones *in vitro*, que ofrece ventajas como el aprovechamiento de hembras de alto valor genético para generar descendencia en cantidad, la reducción del intervalo generacional y, por ende, la aceleración del mejoramiento y la homogeneidad genética en los hatos ganaderos se ha impulsado en algunos países mediante la incorporación de la FSH en programas de producción biotecnológicos, según indican Salgado y colaboradores (2009).

La implementación de protocolos que regulan el desarrollo folicular y la ovulación presenta la ventaja de facilitar la aplicación generalizada de tecnologías reproductivas, como es el caso de la producción de embriones a partir de progenitores con destacada genética, de acuerdo con las afirmaciones de Wheeler y colaboradores (2006).

Stroud (2011) destaca que la producción *in vitro* de embriones, junto con la técnica de obtención de ovocitos mediante aspiración folicular guiada por ultrasonografía (OPU), son biotecnologías reproductivas que han experimentado un progreso significativo en la última década. Gracias a la optimización de procesos, especialmente la obtención de ovocitos a través de OPU, la producción *in vitro* ha avanzado sustancialmente, permitiendo obtener ovocitos repetidamente de una donante de alto valor genético y aumentar significativamente su descendencia.

La aplicación de FSH, específicamente Folltropin®, para la estimulación ovulatoria en la producción de embriones *in vitro* en bovinos, podría ofrecer ventajas sobre otros protocolos que favorecen el desarrollo embrionario de manera limitada. Por lo tanto, resulta crucial impulsar estudios de este tipo para mejorar la calidad reproductiva de los hatos ganaderos en la región de Manabí y en el país en general.

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.2.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del Folltropin® sobre la producción de embriones bovinos *in vitro*.

#### **1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar el número de folículos estimulados bajo el efecto de Folltropin®.

Establecer la cantidad ovocitaria con y sin el uso de Folltropin®.

Calcular la cantidad de embriones producidos *in vitro* con y sin la aplicación de Folltropin®.

Estimar el costo beneficio con la utilización de Folltropin® en la producción de embriones *in vitro*.

### **1.4. HIPÓTESIS**

La Folltropin® mejora la producción de ovocitos y de embriones en bovinos.

## **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN BOVINOS GYR**

La práctica habitual de producir embriones en bovinos de la raza Gyr ha ganado terreno en la industria ganadera, especialmente con la transferencia de embriones (TE). Esta técnica de reproducción ha demostrado ser eficaz, fértil y productiva, lo que ha contribuido a su creciente utilización para aumentar la producción, dada la alta valía genética de estos animales (Oliveira et al., 2020).

Además, diversos estudios han concluido que la producción de embriones in vitro muestra un rendimiento superior en vacas de la raza Gyr. Se observa un mayor número de folículos visualizados, ovocitos recuperados y una tasa de clivaje más elevada en comparación con otras razas (Narváez, 2020; Rosete et al., 2021). Se ha evidenciado que los ovocitos de la raza Gyr presentan un porcentaje superior de viabilidad, y cuando se emplean en la producción de embriones cruzados, se obtienen tasas de embarazo más altas en las etapas finales de la gestación (Elliff et al., 2019).

De acuerdo con Guimarães y colaboradores (2020), la raza Gyr ha demostrado un notable potencial en la selección y mejora genética de rasgos relacionados con la producción embrionaria in vitro. En comparación con otras razas, la raza Gyr exhibe un mayor número de embriones viables y blastocistos por captación de óvulos, así como una tasa de escisión más elevada y un mayor número de ovocitos escindidos en la producción de embriones in vitro.

### **2.2. SELECCIÓN DE DONANTES**

La elección adecuada de animales donantes es un factor crítico en el proceso de reproducción bovina mediante embriones. Se requiere un minucioso proceso de selección de vacas o novillas donantes, con el objetivo de asegurar que la progenie herede únicamente características deseables y descarte aquellas no deseadas (Solís et al., 2022).



En la actualidad, existen diversas herramientas para la selección de donantes en proyectos genéticos que emplean biotecnologías reproductivas. La selección genómica se destaca como un predictor altamente preciso del desempeño genético de los animales (Seidel et al., 2010). A pesar de sus beneficios, los altos costos asociados con los procesos genómicos limitan su utilización a nivel comercial. Como resultado, la selección convencional se ha convertido en el método más comúnmente empleado debido a sus costos más bajos y su fundamento en datos estadísticos y resultados prácticos (Coto et al., 2020).

Según Michel (2022), diversos aspectos del historial materno de la vaca donante, como productividad, fertilidad, peso al destete, porcentaje de crías vivas y muertas, tasa de producción de ovocitos, temperamento, características anatómicas y morfológicas, son fundamentales para la toma de decisiones antes de embarcarse en la reproducción genética.

La viabilidad fisiológica de la donante también es esencial para la selección, siendo la variabilidad en la respuesta a tratamientos superovulatorios una limitante extrema. Se estima que entre el 25-30% de las vacas no producen embriones según estadísticas recientes (Hahn, 1992). Además, las altas tasas de ovocitos sin fertilizar, atribuidas a desórdenes bioquímicos, metabólicos y motrices del oviducto y útero, afectan el éxito y costo de la técnica (Palma y Brem, 2001).

Posterior a la selección, se realiza un chequeo reproductivo y ginecológico, incluyendo ecografías a los ovarios y útero para evaluar su idoneidad para el tratamiento. La valoración de la donadora puede variar según los criterios de los beneficiarios, pero en aplicaciones prácticas para el mejoramiento genético, la elección se orienta hacia las vacas más productivas (Ocampo et al., 2023).

### **2.3. ASPIRACIÓN FOLICULAR**

Hay dos procedimientos para la obtención de ovocitos bovinos, uno post mortem que se realiza en ovarios de matadero, y otro in vivo, utilizando la aspiración folicular guiada por ultrasonografía (ovum pick-up, OPU), junto con instrumentos

complementarios incorporados en los protocolos más recientes (Alvares et al., 2016).

El folículo ovárico, que comprende el ovocito y sus células somáticas asociadas, es la unidad funcional del ovario. El pool de folículos en el ovario está compuesto principalmente por folículos primordiales, que albergan un ovocito en la fase diplotene de la meiosis I, rodeado por una sola capa de células de pre-granulosa elongadas y una membrana basal (McGee y Hsueh, 2000).

La variación en la respuesta, considerada biológicamente crucial en la reproducción animal, está influenciada por factores como la raza. Se ha observado que los animales de la raza Nelore, o las vacas cebuinas en general, tienden a tener un mayor número de folículos reclutados en comparación con las vacas de razas europeas (Seneda et al., 2002; Baruselli et al., 2012). A pesar del potencial similar entre individuos de la misma raza, la variabilidad entre diferentes donantes puede afectar los resultados de la aspiración folicular transvaginal (AFT), según señalan autores como Seneda et al. (2002).

Los folículos en el ovario son cruciales como unidades fundamentales y desencadenantes de los procesos reproductivos y de las fases del ciclo estral. La hormona folículo estimulante (FSH) desempeña un papel clave en la esteroidogénesis folicular, encargándose de la producción de estrógenos y del crecimiento y maduración del folículo dominante (Motta et al., 2011).

El procedimiento de OPU se realiza previa sedación de las vacas con xilacina al 2% (0.02 mg/kg). Posteriormente, las vacas son inmovilizadas en un brete, se vacía el contenido rectal, y se administra una dosis de anestésico epidural con Bupivacaina al 0.5% (0.3 mg/kg). Se utiliza un ecógrafo equipado con un transductor convexo de 5 MHz acoplado a una guía de aspiración. Este dispositivo incluye una aguja de 18G x 75 mm conectada a una tubería plástica de 1 mm de diámetro y 2 m de longitud, junto con una bomba de vacío regulada a 90 mmHg, que dirige el líquido folicular por succión a un tubo estéril de 50 ml (Alvarado et al., 2020).

Los complejos cúmulo-ovocito se recolectan en una solución buffer fosfato salino (PBS, Sigma, P-4417) a 38.5 °C, suplementada con 1% de suero fetal bovino y 10

UI/ml de heparina. El líquido colectado se lleva al laboratorio, se filtra y se lava con buffer fosfato salino atemperado a 38.5 °C. El líquido filtrado es vertido en una caja de búsqueda de 95 mm, y los ovocitos son identificados bajo un estereoscopio (Alvarado *et al.*, 2020).

Los ovocitos son seleccionados mediante tres lavados en un fluido oviductal sintético tamponado con Hepes (hSOF). Posteriormente, se clasifican en calidad A, B o C utilizando los criterios establecidos por Hawk y Wall (1994), quienes evaluaron características del citoplasma, zona pelúcida y células del cúmulo.

## **2.4. SELECCIÓN DE OVOCITOS**

La cantidad de ovocitos recolectados mediante OPU está condicionada por el número de folículos con un diámetro de  $\geq 2$  mm al momento de realizar las aspiraciones. El propósito de los tratamientos de estimulación con FSH es incrementar el número de folículos a partir de los ovocitos recogidos durante la OPU. La gestión del crecimiento de las ondas foliculares y el uso de gonadotropinas son estrategias valiosas para potenciar y optimizar la recuperación de ovocitos de animales genéticamente superiores (Chaubal *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2018; Ongaratto *et al.*, 2020).

La calidad de los ovocitos está fuertemente vinculada a su clasificación y selección una vez aspirados. No todos los ovocitos recolectados serán empleados, ya que muchos de ellos pueden presentar daños o anomalías que los hacen inapropiados para la maduración y, por ende, no competentes. Se requieren ovocitos con citoplasma homogéneo y que posean al menos tres capas de células del cumulus oophorus (Hincapié, 2015).

En relación con los medios de cultivo utilizados en las diferentes etapas, es fundamental garantizar parámetros biofísicos de excelente calidad, destacando la osmolaridad, el pH, la concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, la concentración de nutrientes, la calidad del agua, y las fuentes de energía y proteínas. Debido a la diversidad de componentes en los medios, se han categorizado en indefinidos y definidos, con el propósito de investigar el efecto y la función de cada componente en la producción

final de embriones, la viabilidad durante los procesos de criopreservación y el porcentaje de crías viables (Hincapié, 2015).

### 2.4.1. CLASIFICACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS OVOCITOS BOVINOS

En los programas de reproducción asistida en bovinos, la clasificación de los ovocitos desempeña un papel crucial al facilitar la selección de aquellos con mayor calidad para la fertilización in vitro. Esta práctica tiene como objetivo maximizar las oportunidades de obtener embriones viables, los cuales serán transferidos con el fin de asegurar un desarrollo posterior exitoso. Los ovocitos bovinos pueden ser categorizados en diversas clases, considerando aspectos como su madurez y calidad, según indicó Nagano en 2019.

CLASIFICACIÓN	CONCEPTUALIZACIÓN	AUTORES
Los ovocitos inmaduros (OOI)	Se obtienen directamente de los folículos ováricos durante la aspiración y no han completado su proceso de maduración	(Zhang, 2022)
Los ovocitos maduros (OOM)	Han alcanzado la madurez completa y han completado las meiosis I y II, lo que los hace ideales para la fertilización in vitro (FIV)	Foster (2022)
Los ovocitos degenerados	Pueden haberse dañado durante el proceso de aspiración o mostrar signos de degeneración, lo que reduce su viabilidad para la fertilización	Águila <i>et al.</i> , (2020)
Los ovocitos atréticos	Proviene de folículos atréticos que no han alcanzado la madurez completa y se han degenerado, lo que resulta en una tasa de desarrollo baja después de la fertilización	Roelen (2020)
Los ovocitos de baja calidad	Presentan anomalías morfológicas o citoplasmáticas, lo que afecta negativamente a su capacidad para ser fertilizados y desarrollarse adecuadamente	Stanislavovich <i>et al.</i> , (2019)

## 2.5. DESARROLLO DE EMBRIONES

La aplicación de estas técnicas posibilita la obtención de ovocitos con mayor viabilidad y capacidad para la fertilización, así como un desarrollo posterior que resulta en embriones de calidad considerada adecuada para su transferencia a los animales receptores. Este éxito se atribuye a que los tratamientos con FSH estimulan una proporción superior de folículos de tamaño mediano, en comparación con la recolección de folículos de donantes que no han sido sometidos a superestimulación folicular mediante FSH (Goodhand *et al.*, 1999; De Roover *et al.*, 2008; Sendag *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2018).

La producción de embriones involucra tres fases: la maduración in vitro (MIV) de los ovocitos, la fecundación in vitro (FIV) y el cultivo in vitro (CIV) de los posibles

cigotos. El objetivo de estas etapas es obtener blastocistos de calidad, lo que contribuye a una eficiencia reproductiva mejorada y al mejoramiento genético de los rebaños (Salgado y Lopera, 2020).

### **2.5.1. MADURACIÓN DE EMBRIONES**

La maduración de embriones en bovinos emerge como una herramienta fundamental para los ganaderos que buscan impulsar la mejora genética y la eficiencia reproductiva de sus hatos. Sin embargo, su implementación exitosa demanda un enfoque equilibrado que tenga en cuenta aspectos éticos, técnicos y de bienestar animal (Kein et al., 2023).

Esta técnica es de vital importancia en la reproducción asistida y ha transformado la industria ganadera al proporcionar a los criadores un mayor control sobre la calidad genética de sus rebaños. El proceso se lleva a cabo *in vitro*, posibilitando la manipulación cuidadosa de los ovocitos fertilizados en condiciones de laboratorio antes de reintroducir los embriones desarrollados en las hembras receptoras (Farmer, 2022).

Según Razza et al. (2019), la maduración de embriones brinda a los criadores la capacidad de gestionar y mejorar la eficiencia reproductiva, acelerar el progreso genético y preservar la genética deseada. Esta técnica se erige como una herramienta valiosa en la reproducción asistida de la industria ganadera, permitiendo maximizar la producción de descendencia con características genéticas específicas.

### **2.5.2. FERTILIZACIÓN DE EMBRIONES**

La fertilización de embriones en bovinos representa una técnica avanzada en el ámbito de la reproducción asistida, otorgando a los ganaderos un mayor dominio sobre la genética y la reproducción en sus rebaños. Este procedimiento se ejecuta *in vitro*, en un entorno de laboratorio, y ha adquirido importancia como una herramienta valiosa para mejorar la eficiencia reproductiva y perfeccionar las características genéticas deseables en el ganado bovino (Marlendi et al., 2022).

El proceso comienza con la extracción de ovocitos de las hembras donantes, los cuales se combinan posteriormente con espermatozoides seleccionados en un ambiente controlado para facilitar la fertilización. Mediante este procedimiento, se emula el proceso natural de fecundación que normalmente ocurre en el tracto reproductivo de la hembra. Posterior a la fertilización, los embriones resultantes son cultivados en un medio especializado que proporciona las condiciones óptimas para su desarrollo (De Lucena et al., 2023).

### **2.5.3. CULTIVO DE EMBRIONES**

Una vez que los ovocitos han sido fertilizados in vitro, el siguiente paso es el cultivo de los embriones resultantes. Según Camargo et al. (2022), este proceso se realiza en un medio de cultivo especializado diseñado específicamente para proporcionar los nutrientes necesarios y crear un entorno óptimo para el desarrollo embrionario. Este medio de cultivo constituye una solución equilibrada que imita las condiciones fisiológicas naturales presentes en el tracto reproductivo de la hembra.

La etapa de cultivo de embriones bovinos se revela como una fase crítica en el proceso de reproducción asistida, implicando el desarrollo y crecimiento de embriones fuera del organismo de la hembra bovina, según lo señalado por Gallego et al. (2022). Este proceso no solo aumenta la probabilidad de obtener descendencia con calidad genética, sino que también facilita la conservación y distribución de material genético valioso. Además, la técnica ofrece flexibilidad en la gestión del ganado, permitiendo a los criadores trabajar con animales de alto valor sin enfrentar los desafíos asociados con el transporte físico (Arias et al., 2022).

### **2.5.4. CLASIFICACIÓN DE EMBRIONES**

La elección de embriones de alta calidad durante el periodo de cultivo emerge como un aspecto crucial. Aquellos embriones que exhiben un desarrollo óptimo y una estructura celular saludable son considerados los más apropiados para procedimientos posteriores, como la transferencia a hembras receptoras (Wrenzycki, 2021). La capacidad de seleccionar embriones de alta calidad desempeña un papel significativo en el éxito de los programas de mejora genética y en la eficacia reproductiva del ganado bovino (Démétrio et al., 2020).

Esta clasificación se fundamenta en diversos criterios, que abarcan desde la morfología hasta el grado de desarrollo de los embriones. A continuación, se ofrece una descripción minuciosa de la clasificación de embriones bovinos:

<b>Criterio de Clasificación</b>	<b>Descripción</b>
Estadio de Desarrollo:	Los embriones bovinos se clasifican según su estadio de desarrollo, que incluye la mórula, blástula y la etapa de blastocisto. La clasificación se realiza según el número de células y la aparición de la cavidad blastocística.
Morfología Celular:	Se evalúa la morfología celular de los embriones, examinando la uniformidad de las células, la presencia de fragmentación celular y la apariencia general de la estructura embrionaria.
Categorías de Calidad:	Los embriones se clasifican en categorías de calidad, como Excelente (morfológicamente óptimos), Bueno (calidad aceptable con signos normales de desarrollo), Regular (con alguna anomalía o fragmentación) y Pobre (morfología anormal o alta fragmentación).
Evaluación del Tamaño de la Cavidad Blastocística:	En embriones en etapa de blastocisto, se evalúa el tamaño de la cavidad blastocística. Un desarrollo adecuado de esta cavidad es indicativo de un embrión saludable y bien desarrollado.
Grado de Expansión del Blastocisto:	Se considera el grado de expansión de la cavidad blastocística en embriones en etapa de blastocisto. Este criterio proporciona información adicional sobre la calidad y viabilidad del embrión.
Uniformidad Celular:	La uniformidad en la cantidad y distribución de las células es crucial. La presencia de células uniformes y bien distribuidas indica un embrión de mayor calidad.
Evaluación del Citoplasma y Núcleo:	Se examinan el citoplasma y el núcleo celular para identificar posibles anomalías que podrían afectar la viabilidad del embrión.

Fuente: Adaptaciones tomadas de Peláez (2011)

## **2.6. LA FSH EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *in vitro***

La hormona más comúnmente empleada en programas de transferencia de embriones bovinos es la FSH-p, y su tratamiento implica la aplicación de dos dosis diarias durante cuatro días, iniciando entre los días 8 y 12 del ciclo estral. Aunque existen otras hormonas que pueden inducir la superovulación, como la EPE (extracto de pituitaria equina), FSH-o (extractos de pituitaria ovina) y HMG (gonadotrofina aislada de mujeres en menopausia), su utilización es limitada (Takedomi et al., 1995).

Debido a la corta vida media de la FSH (aproximadamente 5 a 12 horas), se requiere de múltiples aplicaciones intramusculares para lograr el efecto de superovulación en las hembras bovinas. Los protocolos más usuales implican seis a ocho aplicaciones de FSH con intervalos de doce horas, permitiendo el desarrollo de varios folículos y provocando ovulación múltiple para aumentar la obtención de embriones en la colecta (Fonseca et al., 2001).

Aunque la inyección única, vía subcutánea, ha demostrado ser efectiva en inducir superovulación, los estudios sugieren que múltiples inyecciones intramusculares producen una mayor cantidad de embriones congelables y transferibles en comparación con la administración única (Kelly et al., 1997).

Investigaciones recientes sugieren que las vacas donadoras responden de manera más favorable a los tratamientos de superovulación con FSH cuando son jóvenes, y la cantidad de sangre de *Bos indicus* influye en la respuesta, con donadoras más jóvenes y con mayor influencia de *Bos indicus* necesitando menor cantidad de FSH (Hernández S., 2019).

A pesar de estos avances, la investigación sobre el uso de FSH continúa para mejorar la eficiencia reproductiva en la producción de embriones. El incremento en los programas de reproducción bovina mediante la fertilización in vitro de embriones destaca la importancia de estudios en esta área para avanzar en el conocimiento científico en la ganadería.

Los resultados de Morera et al. (2022) indican que la estimulación hormonal con FSH (Folltropin®) a una concentración de 350 UI/animal aumenta el número de folículos aspirados, así como la cantidad y calidad de los ovocitos en comparación con los ensayos sin estimulación hormonal. Además, se observa un mejor desempeño en términos de tasa de recuperación de ovocitos y eficacia reproductiva en los animales tratados con FSH en comparación con el protocolo hormonal convencional (Morera et al., 2022).

### **2.6.1. FOLLTROPIN®**

Folltropin principalmente promueve directamente el crecimiento de los folículos ováricos, la administración de FSH exógena a mamíferos en el momento de aparición de la ola folicular estimula el crecimiento de todos los folículos de más de 1,7 mm de diámetro que normalmente terminarían en atresia durante cada ciclo de celo (Vetoquinol, 2023).

Múltiples folículos en crecimiento requieren estimulación de FSH hasta alcanzar una madurez suficiente para responder a LH en las fases finales de maduración y ovulación, este proceso dura aproximadamente 4 días, en el ganado bovino, los

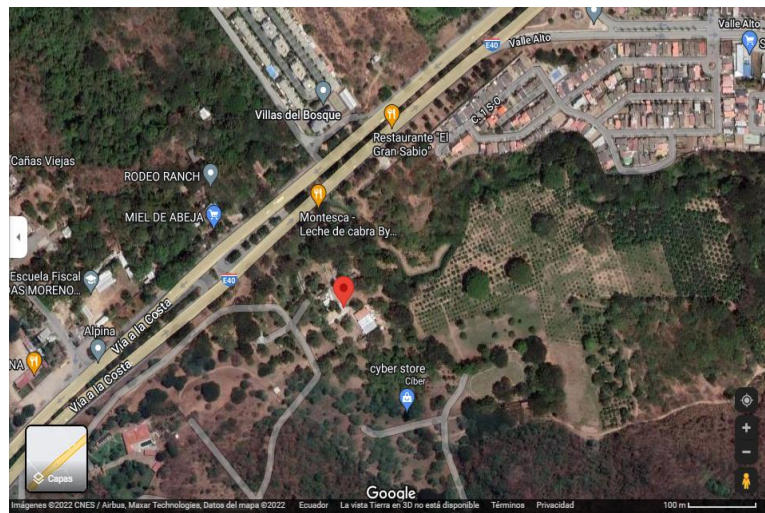


óvulos fecundados producidos mediante superovulación con FSH, PMSG y otros agentes farmacológicos que contienen altas concentraciones de LH han demostrado una menor fertilización, administrada mediante inyección intramuscular, la FSH de Folltropin es absorbida rápidamente desde el lugar de la inyección, tiene una semivida de 5 horas y es indetectable en el flujo sanguíneo 12 horas después de la inyección (Vetoquinol, 2023).

# CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

## 3.1. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación se desarrolló en la provincia de Guayas, en el cantón Guayaquil, empresa IRAE-ECOSAN S.A, ubicado en la Hacienda “Aldeana”, entre las coordenadas geográficas, 2°12'25''S de latitud sur y 80°04'00'' de latitud oeste; en el km 22 de la vía a la Costa, Guayaquil; la temperatura media va desde los 31 ° C, y 21,91 m.s.n.m.



Fuente. Google Earth, (2022)

## 3.2. CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS

Tabla 3.1. Condiciones climáticas de la hacienda Aldeana.

Condiciones climáticas	Promedios
Pluviosidad media anual (mm)	1350
Temperatura media anual (°C)	28
Humedad relativa anual (%)	80
Heliofanía anual (horas/sol)	4380
Evaporación anual (mm)	1652,3

Fuente: Instituto nacional meteorología e hidrografía (2020).

## 3.3. DURACIÓN DEL TRABAJO

La investigación tuvo una duración de cinco meses, los cuales se distribuyeron de la siguiente manera: 16 semanas a nivel de campo y laboratorio y cuatro semanas para tabulación y redacción de informe final de tesis.

## **3.4. MÉTODOS Y TÉCNICAS**

### **3.4.1. MÉTODOS**

En esta investigación se aplicó el método experimental, donde un conjunto de variables se mantuvo constantes, mientras que el otro conjunto de variables se midió como sujetos del experimento (Hernández y Escobar, 2019).

### **3.4.2. TÉCNICAS**

Mientras que como técnica se utilizó la observación y medición que permitió la verificación y análisis de las muestras evaluadas Anguita *et al.*, 2003).

## **3.5. FACTOR EN ESTUDIO**

FSH (Folltropin®).

## **3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Esta investigación se desarrolló mediante un diseño *Cross Over*, donde todos los animales pasaron por ambos grupos experimentales (con y sin tratamiento), además se efectuó un estudio de tipo experimental que incluyó datos descriptivos y comparativos entre los tratamientos, no se usaron diseños experimentales tradicionales, por ese motivo en el proceso de análisis de datos se aplicaron los procedimientos de los modelos lineales generalizados y mixtos.

## **3.7. UNIDAD EXPERIMENTAL**

Las unidades experimentales se constituyeron por un total de 25 vacas cíclicas de raza gyr con un peso promedio de 350 kg, condición corporal de 3 a 3,5 (Houghton *et al.*, 1990) y edad promedio de 36 a 50 meses. El total de los animales pasaron por ambos grupos experimentales tratados con y sin FSH de acuerdo con el momento de la ejecución del experimento.

## **3.8. VARIABLES**

### **3.8.1. VARIABLE INDEPENDIENTE**

Folltropin® sobre la producción de embriones (2,5 ml).

### **3.8.2. VARIABLES DEPENDIENTES**

Cantidad de folículos después de la estimulación con Folltropin® (n)

Número de ovocitos viables (n)

Cantidad de embriones viables (n)

Costo beneficio (\$)

## **3.9. MANEJO DEL EXPERIMENTO**

### **3.9.1. SELECCIÓN DE LOS ANIMALES**

La evaluación de la reproductividad de las donadoras, la salud general y la morfología de la donadora son cruciales. La edad y condición corporal también se tomó en cuenta, buscando animales en el rango de edad apropiado entre 2 a 10 años. Es importante que la donadora tenga un historial exitoso de fertilización y producción de ovocitos. Además, el manejo nutricional adecuado y exámenes veterinarios regulares contribuyen a la selección de donadoras que maximizan las posibilidades de éxito en la producción de embriones y la mejora genética del ganado.

### **PROTOCOLO DE APLICACIÓN DE FOLLTROPIN®**

En este estudio se sometieron a la aspiración folicular con una sincronización previa de la onda folicular se aplicó FSH Folltropin®, de la siguiente manera: el día cero 2 mg de BE (Gonadiol®, Zoetis, Argentina), aplicación de dispositivo de P4 de 0,5 gr, 50 mg de progesterona inyectable (Gestavec® 25, Vecol) vía intramuscular con agujas de 1 ½ x 18g pulgadas, cuatro días después se inyectó 50mg FSH (Folltropin®, Vetoquinol) al día 5 se retiró dispositivo y se realizó la aspiración folicular.

El día cinco, se realizó la aspiración folicular mediante ecógrafo (Mindray) DP50 y con una sonda micro-convexa de 8 Mhz, bomba de vacío a una presión de 85 mmHg (Wta) guía de aspiración (Wta), sonda (Mindray). Para empezar el procedimiento, las vacas fueron sedadas con anestesia epidural lidocaína al 2 %.

Luego se procedió a limpiar y desinfectar la vulva y el periné. Se introdujo el transductor dentro de la vagina hasta el fórnix, ubicando la cabeza del transductor en el fórnix de la vagina frente al ovario a ser aspirado. Luego se introdujo la mano izquierda por el recto y se retrajo el ovario, se introdujo el mandril con un circuito cerrado el cual lleva una aguja de 19g en la punta la que se enfrenta con el ovario y es la que extrae los ovocitos.

Pasado 21 días de este tratamiento se procedió a realizar el mismo procedimiento en los mismos animales, pero sin FSH Folltropin®.

### **3.9.2. CANTIDAD DE FOLÍCULOS ANTES Y DESPUÉS DE LA ESTIMULACIÓN**

La evaluación de ovocitos constituye un procedimiento esencial en la producción de embriones bovinos. En primer lugar, se realiza una observación de la morfología ovocitaria, prestando especial atención a la forma y estructura general. La normalidad morfológica es imperativa para asegurar un potencial de desarrollo óptimo.

La integridad de la zona pelúcida, la capa circundante del ovocito se examina para garantizar su estado sin daños. Esta capa desempeña un papel crucial en la protección del ovocito y su interacción eficaz con los espermatozoides durante la fertilización.

La evaluación se extiende al citoplasma y a la distribución de los gránulos corticales dentro del ovocito. Estos aspectos proporcionan indicadores de la salud del ovocito y su capacidad para iniciar el desarrollo embrionario.

La verificación de la madurez nuclear es otro aspecto fundamental, asegurándose de que el ovocito haya completado la meiosis y posea un núcleo maduro. Este proceso es esencial para preparar al ovocito para la fertilización y el consecuente desarrollo embrionario.

La presencia o ausencia de cuerpos extraños dentro del ovocito se controla rigurosamente, ya que cualquier material ajeno debe ser evitado para mantener condiciones óptimas para el desarrollo embrionario.

En síntesis, la evaluación de ovocitos constituye una fase crítica en la producción de embriones bovinos, donde la atención a la morfología, la integridad de la zona pelúcida, la calidad citoplasmática, la madurez nuclear y la exclusión de cuerpos extraños son determinantes para el éxito del proceso.

Estas evaluaciones se realizan mediante microscopía, y los ovocitos de alta calidad se seleccionan para su posterior fertilización in vitro. Es importante llevar a cabo estas evaluaciones con cuidado y precisión para mejorar las tasas de éxito en la producción de embriones.

### **3.9.3. PRODUCCIÓN EN LABORATORIO**

#### **MADURACIÓN**

Durante el proceso de maduración, los ovocitos fueron colocados en una incubadora con medios de cultivo durante un periodo de 22 a 24 horas. La temperatura ideal para la incubación de embriones bovinos se mantiene a 38.5°C, y se recomienda una humedad relativa del 85%. Todo este procedimiento se llevó a cabo en una incubadora THERMO 3031, la cual está equipada con aislamiento de poliuretano sin CFC/HFC para asegurar una temperatura óptima y prevenir la condensación. La puerta calefactada con control energético inteligente evita la condensación, incluso a bajas temperaturas, y cuenta con una sofisticada función de temporizador que puede operar en modos semanal, diario o en tiempo real.

Para este proceso, se empleó el medio TCM-199, reconocido por su riqueza en nutrientes. Este medio fue utilizado tanto para la maduración de ovocitos como para el cultivo de embriones.

#### **FERTILIZACIÓN**

Se empleó el medio FIV TALP enriquecido con 20 µM de penicilina, 10 µM de hipotaurina, y 1 µM de epinefrina (PHE) como suplemento antioxidante y estimulante de la motilidad espermática y la reacción acrosómica. Además, se incorporó heparina para fomentar la capacitación espermática y 1 mM de piruvato. Tras 24 horas de maduración in vitro (MIV), los ovocitos fueron lavados con medio FIV y distribuidos en grupos de 9 a 15 ovocitos en gotas de 50 µl de FIV, donde se

observaron Complejos ovocito-cumulus (COCs) expandidos con características viscosas.

El semen, previamente criopreservado y almacenado en tanques de nitrógeno, fue descongelado a 35°C durante 40 segundos y capacitado mediante gradientes de densidad, una técnica que separa la muestra seminal según la capacidad de los espermatozoides para atravesar distintos medios con densidades diferentes. Los espermatozoides de mejor calidad y mayor movilidad logran llegar hasta el fondo del tubo, atravesando todos los medios con creciente densidad. Este proceso induce cambios bioquímicos en los espermatozoides, resultando en la hiperactivación y facilitando la reacción acrosómica que lleva a la fecundación del ovocito.

La capacitación espermática se llevó a cabo mediante gradientes de densidad del 90% y 45%, Bovipure, depositados en un tubo eppendorf en ese orden. Sobre estos gradientes se colocaron 500 µl de semen contenido en pajillas sin perturbar el gradiente. Posteriormente, se centrifugó a 700 x g durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y el pellet resultante fue reconstituido en 500 µl de medio FIV, centrifugado nuevamente a 700 x g durante 5 minutos. Finalmente, el pellet fue diluido con medio FIV a una concentración final de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL, y se añadieron 10 µl de esta dilución a las gotas de fertilización.

## **CULTIVO DE EMBRIONES**

Al concluir el tiempo de fertilización, se procede a retirar los presuntos cigotos del medio de fertilización in vitro. En una primera etapa, se eliminan las células de cumulus que rodean a los presuntos cigotos, y posteriormente se lleva a cabo su clasificación. Aquellos cigotos que han sido despojados de sus células de cumulus y que exhiben una mayor calidad son trasladados al sistema de cultivo. La eliminación de las células de cumulus puede realizarse mediante pipeteo delicado, empleo de hialuronidasa o agitación en un vórtex.

La clasificación de los presuntos cigotos se ejecuta siguiendo los criterios establecidos para la clasificación ovocitaria, enfocándose en el análisis del

citoplasma. Se busca descartar las estructuras que presenten citoplasmas claros u oscuros, signos de apoptosis o evidencia de degeneración.

El cultivo embrionario comprende el período que abarca desde los presuntos cigotos hasta la formación de blastocistos, desarrollándose entre el primer y séptimo día del desarrollo embrionario.

### **3.9.4. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN CANTIDAD**

La cantidad de embriones bovinos se pueden medir a través de varios métodos:

#### **Medición de Cantidad:**

La valoración de la calidad de los embriones bovinos constituye un proceso crucial en la producción in vitro de embriones. La evaluación de calidad se realiza mediante la observación de características morfológicas, tales como la forma, tamaño, simetría y la presencia de fragmentación.

Los embriones se clasifican en tres categorías según su calidad: grado 1, grado 2 y grado 3. Aquellos clasificados como grado 1 presentan la mejor calidad, mientras que los embriones de grado 2 se consideran de calidad media. Por otro lado, los embriones clasificados como grado 3 no exhiben una buena calidad y tienen una capacidad de implantación inferior.

### **3.9.5. ANÁLISIS COSTO BENEFICIO**

Para el análisis del beneficio sobre el costo de las experimentaciones, se dividió los ingresos por unidad experimental en función del número de embriones viables producidos, con sus respectivos costos y beneficios netos asociados, este cálculo se desarrollará para cada variación de tratamiento en general (Plúa, 2018).

Costo-Beneficio = Total de ingresos por venta de embriones / Total de egresos por experimentos



## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE FOLÍCULOS ESTIMULADOS BAJO EL EFECTO DE FOLLTROPIN®.

La administración de la hormona foliculoestimulante (FSH - Folltropin®) en las unidades sujetas a experimentación, ha demostrado tener un impacto significativo en la obtención de folículos estimulados. Los resultados presentados en la Tabla 4.1 revelan que las unidades experimentales tratadas con esta experimentación mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ ) en comparación con aquellas que no recibieron FSH, exhibiendo una media de 15 folículos aspirados por vaca, en contraste de la media de 10 folículos para el grupo control.

Tabla 4.1. Número de folículos estimulados.

Experimentaciones	Media	E.E.
FSH	15.32 a	0.64
SIN FSH	10.88 b	0.64
P-valor	<0,0001	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) según las estimaciones LSD Fisher y correcciones de p-valor Bonferroni

E.E = Error Estándar

P-valor = Valor de Probabilidad

Los resultados concuerdan con el estudio de Morera *et al.*, (2022), quienes mediante el uso de FSH (Folltropin®) en vacas adultas, mantuvieron una media de 21 folículos estimulados por bovino evaluado, valores superiores a los animales del grupo control que presentaron una media de 8 folículos aspirados. En adicción, Betancourt *et al.*, (2011) obtuvieron una media de 15 folículos ováricos estimulados por vaca Holstein sincronizada con FSH (Folltropin®). Para remarcar, Ledur (2013) también presentó parámetros positivos mediante la aplicación del FSH, con una media de 15 folículos aspirados por vaca *Bos Taurus* sincronizada y 8 folículos para el grupo control.

Estos hallazgos consistentes con investigaciones previas respaldan la efectividad y la consistencia del uso de FSH en la estimulación ovárica en bovinos y aumentar el número de folículos disponibles para la recuperación de ovocitos (Martins, 2014).

Autores como Yilmazbaş *et al.* (2022) sostienen que las experimentaciones con FSH aumentan el número de folículos estimulados en vacas. Por su parte Bó y Mapletoft (2020) indican que los protocolos de tratamiento de la FSH aumentan los niveles circulantes de FSH y los mantienen durante una duración suficiente puede estimular el crecimiento de los folículos antrales y aumentar el número de embriones viables en el ganado bovino.

#### 4.2. ESTABLECIMIENTO DE LA CANTIDAD OVOCITARIA CON Y SIN EL USO DE FOLLTROPIN®.

Los resultados detallados en la Tabla 4.2 revelan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ ) entre las unidades experimentales tratadas con FSH (Folltropin®) y aquellas que no recibieron esta hormona, evidenciando una media de 10 ovocitos viables por vaca, en contraste de la media de 7 ovocitos para el grupo sin FSH.

**Tabla 4.2.** Número de Ovocitos viables.

Experimentaciones	Media	E.E.
FSH	10.16 a	0.40
SIN FSH	7.96 b	0.40
P-valor	0,0001	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) según las estimaciones LSD Fisher y correcciones de p-valor Bonferroni

E.E = Error Estándar

P-valor = Valor de Probabilidad

La evidencia proporcionada anteriormente, que destaca el impacto significativo del FSH en la cantidad de los ovocitos viables, encuentra respaldo en los hallazgos de Samaniego *et al.* (2020) que mediante el uso de FSH, observó una media de 10 ovocitos viables por unidad experimental, contrastando de manera notable con la media de 4 ovocitos registrada para el grupo control.

Aspectos similares reporta Ayala *et al.* (2018) que mediante la inducción de vaquillas estimuladas con FSH lograron obtener más ovocitos viables que en el grupo control. Por último, Morera *et al.* (2022) también presentó parámetros positivos en la obtención de ovocitos viables mediante la implementación del FSH

con una media de 13 ovocitos por vaca, a diferencia del grupo control que presentó una media de 4 ovocitos viables.

Para El-Hayek y Clarke (2015), la hormona foliculoestimulante (FSH) desempeña un papel fundamental en la promoción del crecimiento y desarrollo de ovocitos viables. Esto se atribuye a que los tratamientos con FSH potencian tanto la autorrenovación como la expansión clonal de las células madre ováricas, conduciendo, en última instancia, a la generación de un mayor número de ovocitos (Patel *et al.*, 2013). Lo anterior expuesto, permite potencialmente producir mayores cosechas de ovocitos recuperables para procedimientos de fertilización *in vitro* (Sam *et al.*, 2013; Gosden, 2013)

#### **4.3. CÁLCULO DE LA CANTIDAD DE EMBRIONES PRODUCIDOS *in vitro* CON Y SIN LA APLICACIÓN DE FOLLTROPIN®.**

El conjunto de datos dispuestos en la tabla 4.3 presenta resultados de experimentos con embriones, diferenciando entre aquellos realizados con la presencia de la hormona FSH y los llevados a cabo sin ella. En el grupo con FSH, se observa que el 60% de los 10 embriones totales fueron clasificados como viables, en contraste, en el grupo sin FSH, solo el 37.5% de los 8 embriones totales fueron considerados viables. Estos resultados sugieren una influencia positiva de la FSH en la viabilidad de los embriones, ya que la proporción de embriones viables es más baja en ausencia de esta hormona.

**Tabla 4.3** Cantidad de embriones viables y no viables

<b>Experimentaciones</b>	<b>Embriones totales</b>	<b>Embriones Viables</b>	<b>Embriones no Viables</b>	<b>% Viables</b>
FSH	10	6	4	60%
SIN FSH	8	3	5	37%

De acuerdo con los parámetros observados en la tabla 4.3, se observa que las unidades experimentales estimuladas con FSH mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ ) en contraste con aquellas que no recibieron la experimentación, exhibiendo una media de 6 embriones viables por animal en comparación con los 3 embriones obtenidos para el grupo control.

Tabla 4.4. Número de Embriones Viables.

Experimentaciones	Media	E.E.
FSH	6.08 a	0.36
SIN FSH	3.24 b	0.36
P-valor	<0,0001	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) según las estimaciones LSD Fisher y correcciones de p-valor Bonferroni

E.E = Error Estándar

P-valor = Valor de Probabilidad

Los resultados obtenidos reflejan coherencia con los hallazgos de Zambrano *et al.* (2020) y Salinas (2013) quienes sometieron a protocolos de superovulación con FSH a vacas donantes de embriones de razas mestizas y Holstein Friesian, lograron obtener un número significativamente superior de embriones aptos para ser lavados y transferidos en comparación con otras modalidades de tratamiento.

Este patrón de resultados también se refleja en la investigación de Vieira *et al.* (2015), quienes determinaron que la super estimulación de donantes Holstein con FSH aumentó la eficiencia de la producción *in vitro* al mantener más embriones viables que el tratamiento sin FSH.

En conjunto, los estudios antes mencionados y los resultados obtenidos en esta investigación sugieren de manera consistente de aceptar la hipótesis de investigación en donde la utilización de FSH (Folltropin®) en los protocolos de superovulación, contribuye significativamente a mejorar tanto la producción de ovocitos obtenidos para programas de reproducción asistida en bovinos,

Estudios como el de Gutiérrez *et al.* (2022) y Deguettes *et al.* (2020) Encontraron que incluir protocolos de FSH en procesos de superovulación, resultó en una mejor respuesta ovárica, una mejor calidad embrionaria y un rendimiento superior en la producción de embriones en comparación con los tratamientos convencionales de FSH. Posturas que la respaldan Bó y Mapletoft (2020) y Ferré *et al.* (2019) quienes mediante diferentes protocolos de superovulación en vacas encontraron que la estimulación con FSH combinada aumentaba el número de ovocitos viables recolectados y las tasas de desarrollo embrionario viables.

#### 4.4. COSTO BENEFICIO CON LA UTILIZACIÓN DE FOLLTROPIN® EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *in vitro*.

De acuerdo con lo detallado en la tabla 4.5, se observa que el experimento con FSH mantuvo una producción de 6 embriones viables por unidad experimental, lo que generó ingresos totales de \$600,00, contrarrestados por egresos asociados a FSH con un costo total de \$50,00, que resultó en un beneficio neto positivo de \$550,00 por unidad experimental. En comparación, el experimento sin FSH, produjo un total de 3 embriones viables por bovinos, lo que generó ingresos totales de \$300,00, sin costos asociados a egresos. Este análisis destaca la superioridad económica del tratamiento con FSH, evidenciando un beneficio neto más sustancial en términos monetarios.

**Tabla 4.5** Análisis costo beneficio de las experimentaciones aplicadas.

Experimento	Ingresos				Egresos				Beneficio neto
	Unidad	Total	Ingreso Unitario	Ingreso Total	Unidad	Total	Costo Unitario	Costo Total	
Con (FSH)	Embriones Viables	6	100	\$600,00	(Folltropin®)	2,5 ml	\$50,00	\$50,00	\$550,00
Sin (FSH)	Embriones Viables	3	100	\$300,00	—	—	—	—	\$300,00

**Nota:** El análisis costo-beneficio refleja la comparación económica entre los dos enfoques experimentales, uno con la administración de FSH (Folltropin®) y otro sin dicha administración. Los ingresos se calculan por unidad experimental en función del número de embriones viables producidos, con sus respectivos costos y beneficios netos asociados.

Se evidencia que el tratamiento con FSH exhibe una mayor eficacia en la obtención de folículos, ovocitos viables y embriones que sustenta ingresos superiores en comparación con el tratamiento de control, lo que lo posiciona como una estrategia rentable en el contexto de la reproducción bovina. Esta observación corrobora los hallazgos de Palomino *et al.* (2020), quienes sugieren que el tratamiento con FSH antes de la captación de óvulos puede aumentar significativamente el número de embriones transferibles.

Esta convergencia de resultados resalta la posición estratégica y rentable del tratamiento con FSH en el contexto de la reproducción bovina, evidenciando su potencial impacto positivo tanto en la calidad reproductiva como en la viabilidad económica de programas comerciales de transferencia de embriones (Sawar *et al.*, 2020; Zambrano *et al.*, 2020).

# **CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## **5.1. CONCLUSIONES**

La administración de la hormona foliculoestimulante (FSH - Folltropin®) en las vacas sujetas a experimentación, resultó en un significativo número de folículos estimulados en contraste con el grupo control que no recibió FSH.

En la valoración de la cantidad de ovocitos viables, se evidenció que la administración de FSH generó un impacto positivo en comparación con el grupo sin tratamiento, las unidades experimentales tratadas con FSH mostraron una cantidad notablemente mayor de ovocitos viables por vaca en contraste con el grupo control.

La aplicación de Folltropin® en las unidades experimentales reveló mejoras significativas tanto en la cantidad como en la calidad de los embriones producidos *in vitro*, en comparación con el grupo control que no recibió FSH.

Los ingresos que se generaron por la producción de embriones con la implementación del FSH, superaron considerablemente a los costos asociados a la experimentación, por lo cual se resalta la viabilidad financiera del tratamiento con Folltropin® para la obtención de embriones viables.

## 5.2. RECOMENDACIONES

Dada la significativa mejora en el número de folículos estimulados, y la obtención de ovocitos y embriones viables y transferibles con la administración del FSH, se sugiere considerar el uso de este protocolo en programas de estimulación ovárica en vacas, y optimizar los resultados en programas de reproducción bovina.

Realizar investigaciones adicionales que exploren la aplicación de diversas dosis de FSH o su combinación con otros protocolos, para obtener una perspectiva más integral sobre cómo las variaciones en la administración de FSH mejora los embriones producidos *in vitro*.

Valorar la factibilidad de implementar el protocolo de FSH en programas de reproducción asistida, tanto en el ámbito investigativo como en la práctica clínica, con el propósito de optimizar la obtención de embriones transferibles y, en consecuencia, mejorar los resultados reproductivos en diversas especies animales.

## BIBLIOGRAFÍA

- Águila, L., Treulén, F., Therrien, J., Felmer, R., Valdivia, M., & Smith, L. C. (2020). Oocyte selection for in vitro embryo production in bovine species: Noninvasive Approaches for New Challenges of Oocyte Competence. *Animals*, 10(12), 2196. <https://doi.org/10.3390/ani10122196>
- Alvarado, J., Argudo, D., Iñiguez, U., Bueno, P., Méndez, M., Soria, M., & Galarza, D. (2020). Análisis morfométrico y funcional de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero y por aspiración folicular transvaginal en vacas criollas del altiplano ecuatoriano. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(2), 1-10. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17838>
- Alvares, P., De Dio, F., Zamparone, L., Rafagnin, L., y Marcondes, M. (2016). *In vitro* production of bovine embryos. New York, USA: Nova Science Publishers. <https://doi.org/p.171-191>
- Anguita, J., Campos, J., & Labrador, J. (2003). "La encuesta como técnica de investigación. Elaboración de cuestionarios y tratamiento estadístico de los datos (I)". *Atención primaria*, 31(8), 527-538. [https://doi.org/10.1016/s0212-6567\(03\)70728-8](https://doi.org/10.1016/s0212-6567(03)70728-8)
- Arias, M. E., Vargas, T., Gallardo, V. A., Águila, L., & Felmer, R. (2022). Simple and efficient chemically defined in vitro maturation and embryo culture system for bovine embryos. *Animals*, 12(21), 3057. <https://doi.org/10.3390/ani12213057>
- Armstrong, D. (1993). Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology* 39, 7-24., 39(1), 7-24. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90021-V](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90021-V)
- Ayala, L., Samaniego, C., Nieto, E., Rodas, C., Dutan, S., Calle, G., Murillo, A., Vázquez, M., Argudo, G., & Perea, F. (2018). Competencia del ovocito bovino obtenido por ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de cresilo. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(2), 552–558. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.13816>
- Betancur, G., Oquendo, J., & Araque, N. (2011). Evaluación de la superestimulación ovárica y la calidad morfológica de ovocitos bovinos obtenidos por aspiración folicular. *Revista Politécnica*, 7(13), 16–21. <https://revistas.elpoli.edu.co/index.php/pol/article/view/188>
- Bó, G. A., & Mapletoft, R. (2020). Superstimulation of ovarian follicles in cattle: Gonadotropin treatment protocols and FSH profiles. *Theriogenology*, 150, 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.001>



- Bó, G., Basto, R., Merchán, L., Ramos, S., Catube, A., Tribulo, R., & Tribulo, A. (2020). Protocolos simplificados de superovulación utilizando FSH y eCG. Memorias del 5 Congreso Internacional de Tecnologías Embrionarias. online: SATE. [https://www.sateweb.org/\\_files/ugd/8f7fa6\\_2e3735122c684d82b64a91c36d0ff316.pdf#page=50](https://www.sateweb.org/_files/ugd/8f7fa6_2e3735122c684d82b64a91c36d0ff316.pdf#page=50)
- Callejas, S., Alberio, R., Cabodevila, J., Dulout, F., Aller, J., & Catalano, R. (2014). El uso combinado de dosis reducidas de FSH-P y de eCG como tratamiento superovulatorio en bovinos. *Revista Argentina de Producción Animal*, 25, 63-73. <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/rapa/article/view/4344/0>
- Camargo, J., Rodrigues, R., Valente, R. S., Müller, D. B., Vireque, A., Belaz, K. R., Bohrer, R., Basso, A., Eberlin, N., Fontes, P., Nogueira, M., & Sudano, M. (2022). Evaluation of a serum-free culture medium for the enhanced vitrification cryosurvival of bovine in vitro-derived embryos. *Livestock Science*, 260, 104922. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2022.104922>
- Cantero, M. (2012). Estimulación ovárica y sus variantes y su efecto sobre la calidad embrionaria; análisis morfocinético mediante cinematografía. *Universitat De València (España)*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=74333>
- Chaubal, S., Molina, J., Ohlrichs, C., Ferre, L., Faber, D., Bols, P., Riesen, J., Tian, X., & X., Y. (2006). Embryo. *Theriogenology*, 65(1), 1631-48.
- Coto, R., Muñoz, J., Oquendo, C., & Guerrero, D. (2020). Experiencias en el uso de la transferencia de embriones para crear un hato Girolando en Pococí, Costa Rica. *Nutrición animal tropical*, 14(2), 187-208. <https://doi.org/10.15517/nat.v14i2.45077>
- De Roover, R., Feugang, M., Bols, E., Genicot, G., & Hanzen, C. (2008). Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle *in vitro* embryo production. *Reproduction in domestic animals*, 43(2), 239-245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00873.x>
- Deguettes, Q., Fattal, E., Moreau, M., Lego, E., & Bochot, A. (2020). Controlled delivery of follicle-stimulating hormone in cattle. *International Journal of Pharmaceutics*, 590, 119904. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119904>
- Démétrio, B., Benedetti, E., Demétrio, C., Fonseca, J., Oliveira, M., Magalhaes, A., & Santos, R. (2020). How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of Holstein embryos produced in vitro? (12 years of practical results at a California dairy farm). *Animal Reproduction*, 17(3). <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2020-0053>

- El-Hayek, S., & Clarke, H. J. (2015). Follicle-Stimulating hormone increases gap junctional communication between somatic and Germ-Line follicular compartments during murine oogenesis<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 93(2). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.129569>
- Elliff, F., Guimarães, É., Féres, L., Bayeux, B., Colli, M., & Baruselli, S. (2019). 132 Effect of treatment with follicle-stimulating hormone on in vitro embryo production of Gyr (*Bos indicus*) calves, pubertal heifers and adult cows. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(1), 191. <https://doi.org/10.1071/rdv31n1ab132>
- Farmer, S. E. (2022). *Regulation of oocyte meiotic resumption using cAMP modulators in bovine in vitro maturation*. [https://doi.org/10.31390/gradschool\\_theses.3977](https://doi.org/10.31390/gradschool_theses.3977)
- Ferré, L., Kjelland, M., Stroud, T., & Ross, P. (2020). 107 Follicular wave synchronization and FSH stimulation prior to ovum pickup for invitro embryo production. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(2), 180. <https://doi.org/10.1071/rdv32n2ab107>
- Fonseca, J., Silva, J., Pinto, A., & Palhares, M. (2001). Superovulated zebu cows embryonic developmental stages. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53(1), 671-676. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0102-09352001000600010>
- Foster, B. (2022). *Characterizing cytoplasmic maturation and improving competence of bovine in vitro matured oocytes*. [https://doi.org/10.31390/gradschool\\_dissertations.4672](https://doi.org/10.31390/gradschool_dissertations.4672)
- Gallego, F., Herrera, C. a. M., Mena, L., & Murillo, A. (2022). *Bovine in vitro Embryo Production: State of the Art*. ESPOCH Congresses, 172–185. <https://doi.org/10.18502/epoch.v2i2.11192>
- Gosden, R. (2013). Programmes and prospects for ovotechnology. *Reproductive Biomedicine Online*, 27(6), 702–709. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.04.019>
- Gradela, A., Malheiros, R., Urbinatti, E., Barbosa, J., Almeida, J., & Esper, C. (2002). Influência do folículo dominante sobre a dinâmica folicular ovariana em vacas Nelore tratadas com FSH. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 37, 325-329. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1413-95962000000400013>
- Guimarães, R., Da Costa, B., Peixoto, M., Viana, J., Ventura, R., Filho, A., & De Carvalho, C. (2020). Genetic analysis of in-vitro embryo production traits in Dairy Gir cattle. *Theriogenology*, 148, 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.014>

- Gutiérrez, M., Aguilera, C., Navarrete, F., Cabezas, J., Castro, F., Cabezas, I., Sánchez, O., García, M., & Rodríguez, L. (2022). Effects of Extra-Long-Acting Recombinant Bovine FSH (BSCRFSH) on cattle superovulation. *Animals*, 12(2), 153. <https://doi.org/10.3390/ani12020153>
- Hahn, J. (1992). Attempts to explain and reduce variability of super ovulation. *Theriogenology*, 38(1), 269-275. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90235-J](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90235-J)
- Hawk, H., & Wall, R. (1994). Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*, 41(8), 1571-1583. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90822-Z](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90822-Z)
- Hernández, C., & Escobar, A. (2019). Introducción a los tipos de muestreo. *Alerta, Revista científica del Instituto Nacional de Salud*, 2(1), 75-79. <https://doi.org/https://doi.org/10.5377/alerta.v2i1.7535>
- Hernández, S. (2019). Actualización de protocolos de transferencia de embriones a tiempo fijo. Universidad Cooperativa de Colombia.
- Hincapié, J. (2015). Obtenido de La Fertilización *in vitro* (FIV) en bovinos: una Biotecnología Reproductiva innovadora al servicio del mejoramiento genético. <https://www.zamorano.edu/2019/03/13/la-fertilizacion-in-vitro-fiv-en-bovinos-una-biotecn>.
- Houghton, P., Lemenager, R., Horstman, L., Hendrix, K., & Moss, G. (1990). Effects of body composition, pre- and postpartum energy level and early weaning on reproductive performance of beef cows and preweaning calf gain. *J. Anim. Sci.*, 68(5), 1438-1446. DOI: 10.2527/1990.6851438x
- Keim, J., Liu, Y., Regouski, M., Stott, R., Сингина, Г. Н., White, K., & Polejaeva, I. (2023). Cytokine supplemented maturation medium improved development to term following somatic cell nuclear transfer (SCNT) in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 35(11), 575–588. <https://doi.org/10.1071/rd23011>
- Kelly, P., Duffy, P., Roche, J., & Boland, M. (1997). Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Animal reproduction science*, 46(1), 1-14. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(96\)01589-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320(96)01589-8)
- Ledur, F. (2013). Control del desarrollo folicular para la obtención de cocs por aspiración guiada por ultrasonografía. [Tesis de Postgrado, Universidad Nacional de Cordova]. Repositorio Institucional. <https://iracbiogen.com/wp-content/uploads/2021/06/CONTROL-DEL-DESARROLLO-FOLICULAR-PARA-LA-OBTENCION-DE-COCS-POR-ASPIRACION-GUIADA-POR-ULTRASONOGRAFIA-Felipe-Ledur-Ongaratto.pdf>

- Lucena, L., Da Silva, K., Prazeres, T., Silva, W., Ferrer, D., & Leite, D. (2023). *Fetal sexing in bovine embryos for in vitro production – literature review*. In Seven Editora eBooks. <https://doi.org/10.56238/alookdevelopv1-047>
- Mardenli, O., Al-Tawash, A., Ibrahim, A., Al-Kerwi, M., Çetinkaya, H., & Al-Shammas, G. (2022). Evaluation of the in vitro embryo production of farm animals under the circumstances of embryo transfer technology. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1060(1), 012068. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1060/1/012068>
- Marelli, B., Díaz, P., Amweg, A., Rey, F., Salvetti, N., & Ortega, H. (2013). Mecanismo de acción de las gonadotrofinas sobre el ovario bovino y su participación en la enfermedad quística ovárica. *Fave Ciencias Veterinarias*, 12(1), 23. <https://doi.org/10.14409/favecv.v12i1/2.4543>
- Martins, G. (2014). *Efeito da estimulação ovariana com o uso de FSH sobre a taxa de recuperação ovocitária e produção in vitro de embriões na raça Sindi*. (xiii, 46). [Disertación de Maestría, Universidad de Brasilia]. <https://repositorio.unb.br/handle/10482/16365>
- Mcgee, E., & Hsueh, A. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200–214. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>
- Michel, M. (2022). Autonomía reproductiva y selección de embriones. *Lustitia et Pulchritudo*, 3(2), 39-52. <https://doi.org/http://ipc.org.pa/ojs/index.php/IEP/article/view/314/495>
- Mogollón, E., & Burla, A. (2013). Superovulación de hembras bovinas: alternativas para reducir el número de inyecciones de fsh. *Spei Domus*, 9(18), 37-47. <https://doi.org/https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/545/518>
- Morera, A., Velasco, E., Herás, S., Romero, J., & Ruiz, S. (2022). Respuesta a la estimulación ovárica mediante FSH (Folltropin®) y rendimiento de OPU en vacas adultas obtenidas por diferentes técnicas de reproducción asistida. *Anales De Veterinaria De Murcia*, 36, 1-17. <https://doi.org/10.6018/analesvet.538651>
- Morera, A., Velasco, E., Romero, J., & Ruiz, S. (2022). Respuesta a la estimulación ovárica mediante FSH (folltropin®) y rendimiento de opu en vacas adultas obtenidas por diferentes técnicas de reproducción asistida. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 36(1), 1-17. <https://doi.org/10.6018/analesvet.538651>
- Nagano, M. (2019). Acquisition of developmental competence and *in vitro* growth culture of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 65(3), 195–201. <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-022>

- Narvaez, H. (2020). Efecto del grupo genético de vacas de las razas Gyr y Holstein sobre la técnica de producción *in vitro* de embriones bovinos. *Corpoica Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 21(3), 1–10. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol21\\_num3\\_art:1697](https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1697)
- Ocampo, F., Colorado, N., & Mantilla, T. (2023). Factores que afectan la tasa de preñez mediante transferencias de embriones por fertilización *in vitro* en novillas multirraciales en condiciones de trópico colombiano. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 14(2), 326-338. [https://doi.org/https://www.google.com/url?q=https://doi.org/10.22319/rmcp.v14i2.6031&sa=D&source=editors&ust=1679946665325430&usg=AOvVaw3\\_ptFZx\\_driskV8-FewfRz](https://doi.org/https://www.google.com/url?q=https://doi.org/10.22319/rmcp.v14i2.6031&sa=D&source=editors&ust=1679946665325430&usg=AOvVaw3_ptFZx_driskV8-FewfRz)
- Oliveira, C., Serapião, R., Camargo, A., De Freitas, C., Iguma, L., De Carvalho, B., De Almeida, L., Oliveira, L., & Da Silva, R. (2019). Oocyte origin affects the *in vitro* embryo production and development of Holstein (*Bos taurus taurus*) - Gyr (*Bos taurus indicus*) reciprocal cross embryos. *Animal Reproduction Science*, 209, 106165. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106165>
- Ongaratto, F., Rodriguez, P., Bertolini, M., & Carlson, D. (2020). Influence of oocyte selection, activation with a zinc chelator and inhibition of histone deacetylases on cloned porcine embryo and chemically activated oocytes development. *Zygote*, 28(4), 286-2. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0967199419000856>
- Palma, G., & Brem, G. (2001). *Biotecnología de la Reproducción*, Cap. I. Edit. INTA.
- Patel, H., Bhartiya, D., Parte, S., Gunjal, P., Yedurkar, S., & Bhatt, M. (2013). RETRACTED ARTICLE: Follicle stimulating hormone modulates ovarian stem cells through alternately spliced receptor variant FSH-R3. *Journal of Ovarian Research*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1757-2215-6-52>
- Peláez, V. A. (2011). *Producción in vitro de embriones bovinos*. [Tesis de Pregrado, Universidad de Cuenca]. Repositorio Institucional. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/3053>
- Plúa, M. (2018). Efecto de dos compuestos hormonales (pg600® y regumate®) en parámetros reproductivos y productivos en cerdas mestizas. [Tesis de Pregrado, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López]. Repositorio Institucional. <https://repositorio.espam.edu.ec/handle/42000/852>
- Razza, E.M., Pedersen, H.S., Stroebech, L. et al. Simulated physiological oocyte maturation has side effects on bovine oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet* 36, 413–424 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1365-4>
- Roelen, B. (2020). Bovine oocyte maturation: acquisition of developmental competence. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(2), 98. <https://doi.org/10.1071/rd19255>



- Rosete, J., Álvarez, H., Urbán, D., Fragoso, A., Asprón, M., Ríos, Á., Pérez, S., & Torre, J. (2021). Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino: cinco décadas de investigación en México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 12(Supl. 3), 39-78. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5918>
- Salgado, E., & Lopera, R. (2020). Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización *in vitro* en bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(3), 1-14. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.17138>
- Salinas, D. (2013). Efecto de la aplicación gonadotrofina coriónica equina (ECG) en vacas donantes superovuladas con folltropin-v (FSH-P liofilizada. [Tesis de Postgrado, Universidad de Cuenca]. Repositorio Institucional. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/3410>
- Sam, T., De Leeuw, R., Verheijden, G., & Koole, A. (2013). Follicle-Stimulating hormone. *Pharmaceutical Biotechnology. Springer eBooks*. 277–283. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6486-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6486-0_13)
- Samaniego, C., Ayala, L., Garzón, D., Brugal, M., Perea, F., Carpio, E., & Escandón, P. (2020). El intervalo de tiempo entre la estimulación ovárica con FSH/LH y la colecta afecta la cantidad, calidad y capacidad de desarrollo de los ovocitos recuperados de novillas criollas ecuatorianas. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 31(1), e17571. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i1.17571>
- Sarwar, Z., Sagheer, M., Sosa, F., Saad, M., Hassan, M., Husnain, A., & Arshad, U. (2020). Meta-analysis to determine effects of treatment with FSH when there is progestin-priming on in-vitro embryo production using ovum pick-up in *Bos taurus* cows. *Animal Reproduction Science*, 221, 106590. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106590>
- Seidel, G. (2010). Brief introduction to whole genome selection in cattle using single nucleotide poly-morphisms. *Reprod Fert Dev*, 22(1), 138-144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/RD09220>
- Sendag, S., Cetin, Y., Alan, M., Hadelar, K., & Niemann, H. (2008). Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 106(1), 208–214. <https://doi.org/208–214>. <https://doi.org/10.1>
- Solíís, A., Vigil, C., & De Armas, R. (2022). Variación interracial e individual en novillas donantes de ovocitos recolectados empleando aspiración folicular transvaginal. *Revista Investigaciones Agropecuarias*, 5(1), 8-17. [https://revistas.up.ac.pa/index.php/investigaciones\\_agropecuarias/article/view/3348/2872](https://revistas.up.ac.pa/index.php/investigaciones_agropecuarias/article/view/3348/2872)

- Stanislavovich, T., Kuzmina, T. I., & Molchanov, A. (2019). Assessment of the destructive processes of chromatin of granulosa cells and functional status of oocyte in bovine ovarian follicles. *Agrarnyj Vestnik Urala*, 191(12), 60–64. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2019-191-12-60-64>
- Stroud, B. (2011). The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsletter*, 29, 14-24. <https://www.redalyc.org/pdf/2890/289060016022.pdf>
- Takedomi, T., Aoyagi, Y., Konishi, M., Kishi, H., Taya, K., Watanabe, G., & Sasamoto, S. (1995). Superovulation of Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 43(7), 1259-1268. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00097-R](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00097-R)
- Vetoquinol. (2023). Folltropin-V. <https://www.vetoquinol.es/products/folltropin-v>
- Vieira, L., & Mapletoft, R. (2016). Superstimulation strategies for ovum pickup in holstein donors. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(2), 256. <https://doi.org/10.1071/rdv28n2ab248>
- Viera, M., & Guerra, M. (2018). Análisis de la eficacia de las técnicas de reproducción asistida: una revisión sistemática. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 41(1), 107-116. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.23938/assn.0254>
- Wheeler, M., Rutledge, J., Fischer, A., VanEtten, T., Malusky, S., & Beebe, D. (2006). Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle. *Theriogenology*, 65, 219-227. [10.1016/j.theriogenology.2005.09.032](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.032)
- Wrenzycki, C. (2022). Parameters to identify good quality oocytes and embryos in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 34(2), 190. <https://doi.org/10.1071/rd21283>
- Yılmazbaş, G., Keskin, A., Karakaya, E., Taşdemir, U., & Gümen, A. (2022). The effect of supplementation of follicle-stimulating hormone (FSH) into the Ovsynch protocol to increase the pregnancy rate in cyclic lactating dairy cows. *Acta Veterinaria Brno*, 91(2), 125–131. <https://doi.org/10.2754/avb202291020125>
- Zambrano, F., Hurtado, E., Arteaga, F., & Mendieta, D. (2020). Dos protocolos de superovulación en donantes de embriones en vacas mestizas en el trópico: Protocolos de superovulación en vacas mestizas. *La Técnica. Revista De Las Agrociencias*. 10(1), 33–44. [https://doi.org/10.33936/la\\_tecnica.v0i23.1115](https://doi.org/10.33936/la_tecnica.v0i23.1115)

Zhang, L. (2022). *In vitro maturation, in vitro fertilization and development of bovine oocytes*. [https://doi.org/10.31390/gradschool\\_disstheses.6146](https://doi.org/10.31390/gradschool_disstheses.6146).



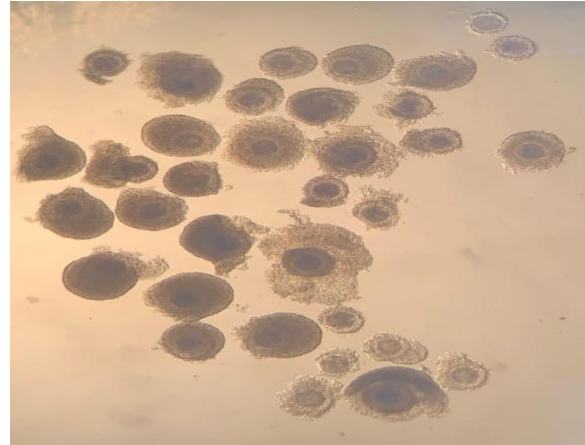
# **ANEXOS**

## Anexo 1. Fotografías tomadas en la aplicación del procedimiento

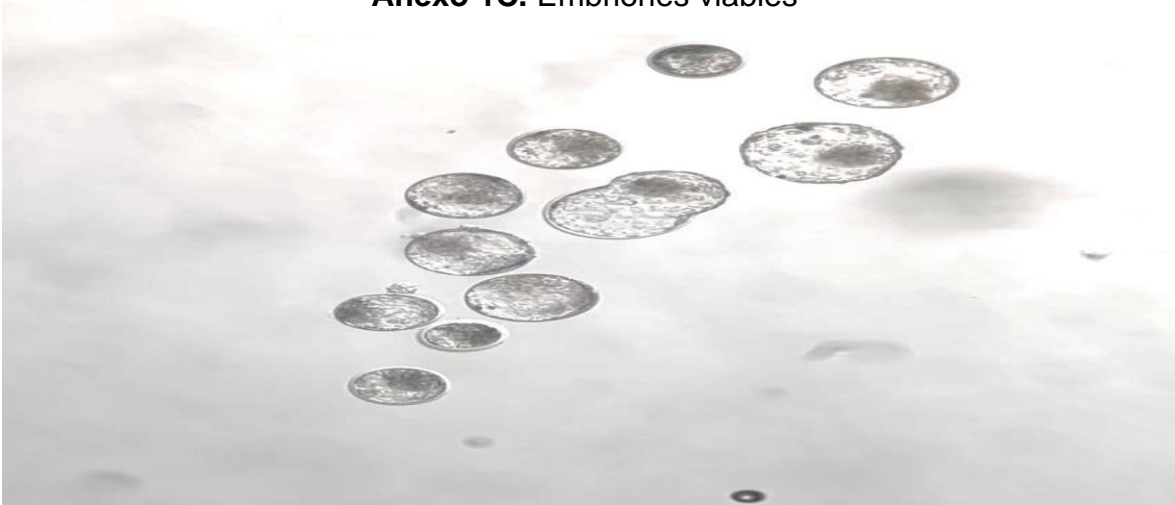
### Anexo 1A. Unidades experimentales



### Anexo 1B. Ovocitos aspirados



### Anexo 1C. Embriones viables



## Anexo 2. Pruebas estadísticas aplicadas para evaluar la experimentación (Modelos Lineales Generalizados Mixtos).

### Modelos lineales generalizados mixtos

#### Especificación del modelo en R

```
mlgm.modelo.000_Numero.de.Foliculos.estimulados_REML<-
glm(Numero.de.Foliculos.estimulados~1+Experimentaciones+ID.RP+Experimenta
ciones+ID.RP
, family=myFamily
, na.action=na.omit
, data=R.data00)
```

#### Resultados para el modelo:

```
mlgm.modelo.000_Numero.de.Foliculos.estimulados_REML
```

Variable dependiente: Numero.de.Foliculos.estimulados

**General**

Familia	Enlace	Convergencia	Escala
gaussian	identity	Alcanzada	10,30

**Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
50	275,78	327,40	-110,89	247,08

AIC y BIC menores implica mejor

**Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos**

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	Pr(>Chi)
NULL				49		2198,50	
Experimentaciones	1	246,42		48		1952,08	<0,0001
ID.RP	24	1705,00		24		247,08	<0,0001

**Pruebas de hipótesis marginales (Wald) para los efectos fijos**

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
Experimentaciones	1	24	23,94	0,0001
ID.RP	24	24	6,90	<0,0001

**Numero.de.Foliculos.estimulados - Medias ajustadas y errores estándares para Experimentaciones**

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni

Experimentaciones	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
FSH	15,32	0,64	15,32	0,64	A
SIN FSH	10,88	0,64	10,88	0,64	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Numero.de.Foliculos.estimulados - Medias ajustadas y errores estándares para ID.RP**

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni

ID.RP	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
07-17 ZAFIRO	31,50	2,27	31,50	2,27	A
05-15 JADE	21,50	2,27	21,50	2,27	A B
360-6 FANTA	20,00	2,27	20,00	2,27	A B C
23-19 FABIA	17,50	2,27	17,50	2,27	A B C D
457-10 SARITA	17,50	2,27	17,50	2,27	A B C D
20-18 GEMA	16,50	2,27	16,50	2,27	B C D
193-18 ARCANA	16,50	2,27	16,50	2,27	B C D
443-19 SANTERA	15,00	2,27	15,00	2,27	B C D
888-18 DAIRA	14,00	2,27	14,00	2,27	B C D
463-19 DELIRIA	13,50	2,27	13,50	2,27	B C D
464-19 DARA	13,50	2,27	13,50	2,27	B C D
368-19 MADONA	13,50	2,27	13,50	2,27	B C D
115-5 MIJA	13,00	2,27	13,00	2,27	B C D
377-19 ROSALIMA	13,00	2,27	13,00	2,27	B C D
454-19 SANTERA	13,00	2,27	13,00	2,27	B C D

415-19 SULAMITA	11,00	2,27	11,00	2,27	B	C	D
228-17 LITA	10,50	2,27	10,50	2,27	B	C	D
35-19 TESSA	10,50	2,27	10,50	2,27	B	C	D
29-19 INDIRA	8,50	2,27	8,50	2,27	B	C	D
199-18 DANIS	7,50	2,27	7,50	2,27	B	C	D
444-19 REGENTA	7,50	2,27	7,50	2,27	B	C	D
18-18 SHAKIRA	6,50	2,27	6,50	2,27		C	D
414-16 FAVELA	6,00	2,27	6,00	2,27		C	D
65-17 LUCIANA	6,00	2,27	6,00	2,27		C	D
136-18 LUCIA	4,00	2,27	4,00	2,27			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Especificación del modelo en R

```
mlgm.modelo.001_Ovocitos.Viables_REML<-
glm(Ovocitos.Viables~1+Experimentaciones+ID.RP+Experimentaciones+ID.RP
, family=myFamily
, na.action=na.omit
, data=R.data00)
```

### Resultados para el modelo: `mlgm.modelo.001_Ovocitos.Viables_REML`

Variable dependiente: `Ovocitos.Viables`

#### General

Familia	Enlace	Convergencia	Escala
gaussian	identity	Alcanzada	4,00

#### Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
50	228,51	280,13	-87,26	96,00

AIC y BIC menores implica mejor

#### Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	Pr(>Chi)
NULL				49		1162,82	
Experimentaciones	1	60,50		48		1102,32	0,0001
ID.RP	24	1006,32		24		96,00	<0,0001

#### Pruebas de hipótesis marginales (Wald) para los efectos fijos

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
Experimentaciones	1	24	15,13	0,0007
ID.RP	24	24	10,48	<0,0001

#### Ovocitos.Viables - Medias ajustadas y errores estándares para Experimentaciones

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni

Experimentaciones	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
FSH	10,16	0,40	10,16	0,40	A
SIN FSH	7,96	0,40	7,96	0,40	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Ovocitos.Viables - Medias ajustadas y errores estándares para ID.RP**

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni

ID.RP	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
07-17 ZAFIRO	22,50	1,41	22,50	1,41	A
05-15 JADE	16,00	1,41	16,00	1,41	A B
360-6 FANTA	15,00	1,41	15,00	1,41	A B C
463-19 DELIRIA	11,50	1,41	11,50	1,41	B C D
23-19 FABIA	11,50	1,41	11,50	1,41	B C D
457-10 SARITA	11,50	1,41	11,50	1,41	B C D
193-18 ARCANA	11,50	1,41	11,50	1,41	B C D
464-19 DARA	11,00	1,41	11,00	1,41	B C D
443-19 SANTERA	11,00	1,41	11,00	1,41	B C D
368-19 MADONA	11,00	1,41	11,00	1,41	B C D
20-18 GEMA	10,00	1,41	10,00	1,41	B C D E
115-5 MIJA	9,50	1,41	9,50	1,41	B C D E
454-19 SANTERA	9,00	1,41	9,00	1,41	B C D E
888-18 DAIRA	8,50	1,41	8,50	1,41	B C D E
377-19 ROSALIMA	8,00	1,41	8,00	1,41	B C D E
228-17 LITA	7,00	1,41	7,00	1,41	C D E
35-19 TESSA	7,00	1,41	7,00	1,41	C D E
29-19 INDIRA	6,50	1,41	6,50	1,41	C D E
65-17 LUCIANA	6,00	1,41	6,00	1,41	D E
444-19 REGENTA	5,00	1,41	5,00	1,41	D E
415-19 SULAMITA	5,00	1,41	5,00	1,41	D E
18-18 SHAKIRA	4,50	1,41	4,50	1,41	D E
414-16 FAVELA	3,00	1,41	3,00	1,41	D E
199-18 DANIS	3,00	1,41	3,00	1,41	D E
136-18 LUCIA	2,00	1,41	2,00	1,41	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Especificación del modelo en R**

```
mlgm.modelo.002_Embriones.Viables_REML<-
glm(Embriones.Viables~1+Experimentaciones+ID.RP+Experimentaciones+ID.RP
, family=myFamily
, na.action=na.omit
, data=R.data00)
```

**Resultados para el modelo: mlgm.modelo.002\_Embriones.Viables\_REML**

Variable dependiente: Embriones.Viables

**General**

Familia	Enlace	Convergencia	Escala
gaussian	identity	Alcanzada	3,15

**Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Deviance
50	216,62	268,24	-81,31	75,68

AIC y BIC menores implica mejor

**Pruebas de hipótesis secuenciales para los efectos fijos**

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	Pr(>Chi)
NULL				49		665,22	
Experimentaciones	1	100,82		48		564,40	<0,0001
ID.RP	24	488,72		24		75,68	<0,0001

**Pruebas de hipótesis marginales (Wald) para los efectos fijos**

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
Experimentaciones	1	24	31,97	<0,0001
ID.RP	24	24	6,46	<0,0001

**Embriones.Viables - Medias ajustadas y errores estándares para Experimentaciones**

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni

Experimentaciones	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
FSH	6,08	0,36	6,08	0,36	A
SIN FSH	3,24	0,36	3,24	0,36	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Embriones.Viables - Medias ajustadas y errores estándares para ID.RP**

Inversa de la función de enlace con efecto aleatorio=0

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni

ID.RP	PredLin	E.E.	Media	E.E.	
07-17 ZAFIRO	16,00	1,26	16,00	1,26	A
05-15 JADE	8,50	1,26	8,50	1,26	A B
464-19 DARA	8,00	1,26	8,00	1,26	B C
360-6 FANTA	7,00	1,26	7,00	1,26	B C
457-10 SARITA	7,00	1,26	7,00	1,26	B C
463-19 DELIRIA	6,50	1,26	6,50	1,26	B C
193-18 ARCANA	6,00	1,26	6,00	1,26	B C
377-19 ROSALIMA	5,50	1,26	5,50	1,26	B C
454-19 SANTERA	5,00	1,26	5,00	1,26	B C
23-19 FABIA	4,50	1,26	4,50	1,26	B C
443-19 SANTERA	4,50	1,26	4,50	1,26	B C
20-18 GEMA	4,50	1,26	4,50	1,26	B C
35-19 TESSA	4,00	1,26	4,00	1,26	B C
368-19 MADONA	4,00	1,26	4,00	1,26	B C
115-5 MIJA	3,50	1,26	3,50	1,26	B C
65-17 LUCIANA	3,50	1,26	3,50	1,26	B C
228-17 LITA	3,00	1,26	3,00	1,26	B C
444-19 REGENTA	3,00	1,26	3,00	1,26	B C
888-18 DAIRA	3,00	1,26	3,00	1,26	B C
18-18 SHAKIRA	2,50	1,26	2,50	1,26	B C
415-19 SULAMITA	2,50	1,26	2,50	1,26	B C
29-19 INDIRA	2,00	1,26	2,00	1,26	B C
414-16 FAVELA	1,50	1,26	1,50	1,26	B C
199-18 DANIS	0,50	1,26	0,50	1,26	C
136-18 LUCIA	0,50	1,26	0,50	1,26	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )