



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

DIRECCIÓN DE POSGRADO Y FORMACIÓN CONTINUA

**INFORME DE INVESTIGACIÓN
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MAGISTER
EN ZOOTECNIA MENCIÓN PRODUCCIÓN ANIMAL**

MODALIDAD:

TRABAJO DE TITULACIÓN

TEMA:

**EFFECTO DEL NIVEL DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA
(HAM) SERÍCA SOBRE LA PRODUCCION DE EMBRIONES
*IN VIVO E IN VITRO***

AUTORES:

**GUSTAVO ADOLFO VELIZ AVEIGA
JORGE LEONARDO PINCAY CEDEÑO**

TUTOR:

Dr. IGNACIO MACIAS ANDRADE, Mg

COTUTOR:

PhD. ERNESTO ANTONIO HURTADO

CALCETA, SEPTIEMBRE 2019

DERECHOS DE AUTORÍA

GUSTAVO ADOLFO VELIZ AVEIGA y JORGE LEONARDO PINCAY CEDEÑO, declaramos bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

GUSTAVO ADOLFO VELIZ AVEIGA

JORGE LEONARDO PINCAY CEDEÑO

CERTIFICACIÓN DE TUTOR

Dr. IGNACIO MACIAS ANDRADE, MG., certifica haber tutelado el trabajo de titulación **EFFECTO DEL NIVEL DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA (HAM) SERÍCA SOBRE LA PRODUCCION DE EMBRIONES *IN VIVO* E *IN VITRO***, que ha sido desarrollada por GUSTAVO ADOLFO VELIZ AVEIGA Y JORGE LEONARDO PINCAY CEDEÑO, previa la obtención del título de Magister en Zootecnia Mención Producción Animal, de acuerdo al **Reglamento de unidad de titulación de los programas de Posgrado** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

Dr. IGNACIO MACIAS ANDRADE, MG

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el trabajo de titulación **EFFECTO DEL NIVEL DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA (HAM) SERÍCA SOBRE LA PRODUCCION DE EMBRIONES IN VIVO E IN VITRO**, que ha sido propuesto, desarrollado por **GUSTAVO ADOLFO VELIZ AVEIGA Y JORGE LEONARDO PINCAY CEDEÑO**, previa la obtención del título de Magister en Zootecnia Mención Producción Animal, de acuerdo al **Reglamento de unidad de titulación de los programas de Posgrado** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

DR. C. EDIS MACÍAS RODRÍGUEZ.
MIEMBRO

MG. CARLOS LARREA IZURIETA.
MIEMBRO

DR.C. ALEX ROCA CEDEÑO.
PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

Las personas que han contribuido con la realización y conclusión de este trabajo son muchas. En primer lugar, quiero agradecer al Dr. PhD Ernesto Antonio Hurtado co-tutor de esta tesis y a mi tutor el Mg Ignacio Macías Andrade por la oportunidad y el apoyo de manera personal e institucional.

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López por brindarme la oportunidad de formarme como profesional y depositar el conocimiento con valor y disciplina.

Gustavo Adolfo Veliz

DEDICATORIA

A la memoria de mi amada madre por todo su apoyo desplegado sin ella no hubiera logrado una meta más en mi vida profesional, gracias por todos esos consejos y palabras de aliento que me ayudaron a crecer como persona y a luchar por lo que uno quiere gracias por tanto cariño mamita.

A mi esposa Katty por todos los esfuerzos y las madrugadas que le tocaba levantarse para que no me fuera sin desayunar. Gracias infinitas mi amor.

A mis hijos Meily, Gustavo y Lady María esto es por ustedes para demostrarles que todo se puede con estudio, constancia y sacrificio.

A mi única hermana Lady Isabel la que ha compartido conmigo sus alegrías y tristezas quien con sus palabras de aliento no me dejaba decaer y siempre ser perseverante cuanto te amo violeta.

Gracias a todos

Gustavo Adolfo Veliz Aveiga

AGRADECIMIENTO

Dios, tu amor y tu bondad no tienen fin, me permites sonreír ante todos mis logros que son resultado de tu ayuda, y cuando caigo me pones a prueba, aprendo de mis errores y me doy cuenta que están en frente mío para que mejore como ser humano, y crezca de diversas maneras.

Este trabajo de tesis ha sido una gran bendición en todo sentido y te lo agradezco padre, y no cesan mis ganas de decir que es gracias a ti que esta meta está cumplida.

Gracias por estar presente no solo en esta etapa tan importante de mi vida, sino en todo momento ofreciéndome lo mejor y buscando lo mejor para mi persona.

Cada momento vivido durante todos estos años, son simplemente únicos, cada oportunidad de corregir un error, la oportunidad de que cada mañana pueda empezar de nuevo, sin importar la cantidad de errores y faltas cometidas durante el día anterior, gracias dios padre.

Jorge Pincay Cedeño

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi madre Santa María Cedeño Sábado que siempre me apoyo incondicionalmente en la parte moral y económica para que no desmayara hasta ver a su hijo como un profesional de la patria, todo lo que soy es por ti madre.

A la Srta. Yadira Elisabeth Vera Reina por su paciencia y dedicación en estos años, tu ayuda ha sido fundamental, has estado conmigo incluso en los momentos más turbulentos, este proyecto no fue fácil, pero estuviste motivándome, al nunca perder la fe ni la esperanza en mi persona.

A mi compañero de maestría y tesis. Dr. Gustavo Adolfo Veliz Aveiga, a su esposa Sra, Carmen Katherine Zambrano Sornosa, por la motivación y su gran aporte en aquellos tiempos de colegiatura, a su Sra. Madre +Lady María Aveiga Verduga. Por su incondicional aporte e invaluable ser humano y consejera para que este par de profesionales no desmallen ni claudique en sus trajinar diario y se vea cumplido sus sueños de madre.

A mi amada Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "MFL", la que me avisto crecer como persona y profesional, a sus docentes, admirativos, a mi tutor, al cotutor, a los miembros del tribunal, al coordinador de la maestría y personal que labora por su aporte, paciencia y empuje de ver culminar una etapa, como profesionales en tan distinguida alma máter.

Jorge Pincay Cedeño

CONTENIDO GENERAL

PORTADA.....	i
DERECHOS DE AUTORÍA	ii
CERTIFICACIÓN DE TUTOR	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
DEDICATORIA.....	viii
CONTENIDO GENERAL.....	ix
CONTENIDO DE TABLAS	xii
CONTENIDO DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	2
1.3. OBJETIVOS	4
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	4
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
1.4. HIPÓTESIS.....	5
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS.....	6
2.2. CICLO ESTRAL DEL BOVINO	6
2.2.1. ETAPAS DEL CICLO ESTRAL DEL BOVINO	7
2.2.2. CONTROL NEUROENDOCRINO DEL CICLO ESTRAL	7

2.2.3. HORMONAS QUE INTERVIENE EN EL CICLO ESTRAL.....	9
2.2.3.1. HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH)	9
2.2.3.2. HORMONAS GONADOTRÓPICAS O GONADOTROPINAS	10
2.2.3.3. HORMONAS GONADALES	11
2.2.4. PROSTAGLANDINA F2 α	12
2.2.5. REGULADORES PEPTÍDICOS	13
2.3. DINÁMICA FOLICULAR	14
2.3.1. DINÁMICA FOLICULAR DURANTE EL CICLO ESTRAL	15
2.4. CRECIMIENTO FOLICULAR.....	15
2.5. SUPEROVULACIÓN	16
2.5.1. FACTORES QUE ALTERAN LOS RESULTADOS DE LOS PROTOCOLOS SUPEROVULATORIOS.....	17
2.6. POBLACIÓN DE FOLÍCULOS ANTRALES Y LA HORMONA ANTIMULLERIANA EN EMBRIONES <i>IN VITRO</i> O <i>IN VIVO</i>	19
2.7. HORMONA ANTIMULLERIANA.....	20
2.8. POBLACIÓN DE FOLÍCULOS ANTRALES Y LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA EN EMBRIONES <i>IN VITRO</i> O EN <i>VIVO</i>	21
2.9. MEDICIÓN DE NIVELES DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA – TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO ELISA.....	22
2.10. ULTRASONIDO EN EL CONTEO FOLÍCULAR	23
2.11. ASPIRADO FOLÍCULAR	24
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	25
3.1. UBICACIÓN.....	25
3.2. CONDICIONES CLIMÁTICAS	25
3.3. DURACIÓN DEL TRABAJO	25
3. 4. FACTORES EN ESTUDIO	26
3. 5. TRATAMIENTOS.....	26

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL	26
3.7. UNIDAD EXPERIMENTAL	27
3.8. VARIABLES MEDIDAS.....	27
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
3.10. PROCEDIMIENTO.....	28
3.10.1. MÉTODOS Y TÉCNICAS	28
3.10.2. MANEJO DEL EXPERIMENTO	29
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1. PRODUCCIÓN EMBRIONARIA <i>IN VIVO</i>	34
4.2. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES <i>IN VITRO</i>	41
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
5.1. CONCLUSIONES.....	53
5.2. RECOMENDACIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	64

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 3.1. Condiciones Climáticas de la estación experimental INIAP-Pichilingüe.....	25
Tabla 3.2. Listado de tratamientos evaluados	26
Tabla 3.3. Esquema de Análisis de Varianza	27
Tabla 3.4. Protocolo superovulación para vacas	31
Tabla 3.5. Protocolo de superovulación vaconas	32
Cuadro 4.1. Estadística descriptiva para las variables estructuras embrionarias, embriones transferibles, degenerados e infertilizados, cuerpos lúteos, folículos anovulatorios y total de estructuras ováricas en la condición in vivo.....	35
Cuadro 4.2. Resumen del análisis de varianza para las variables estructuras embrionarias, embriones transferibles, degenerados e infertilizados, cuerpos lúteos, folículos anovulatorios y total de estructuras ováricas en la condición in vivo.	37
Cuadro 4.3. Comparación de promedios del número de embriones transferibles en dos niveles séricos de HAM.....	38
Cuadro 4.4. Estadística descriptiva para las variables ovocitos G1, ovocitos G2, ovocitos G3, ovocitos sin cumulus, ovocitos expandidos, ovocitos atrésicos, ovocitos degenerados y total ovocitos en la condición in vitro.	42
Cuadro 4.5. Estadística descriptiva para las variables ovocitos en el laboratorio, Blastocito expandido, blastocitos en eclosión y eclosionados; embriones transferibles, G1 y G2 en la condición in vitro.....	45
Cuadro 4.6. Resumen del análisis de varianza para las variables ovocitos G1, G2 y G3; ovocitos sin cumulus; ovocitos expandidos, ovocitos atrésicos y degenerados y total de ovocitos en la condición in vitro	47
Cuadro 4.0.7. Resumen del análisis de varianza para las variables ovocitos en laboratorio, blastocitos expandido, blastocitos en eclosión y eclosionados; embriones tranferibles, G1 y G2 en la condición in vitro.	48
Cuadro 4.8. Comparación de promedios del número de ovocitos G3 en dos niveles séricos de la hormona antimülleriana.....	49
Cuadro 4.9. Comparación de promedios del número de ovocitos expandidos en dos categorías de hembras Brahmán.	50

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 2.1. Interacciones hormonales del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario-Útero	9
Figura 2.2. Modelo esquemático de las ondas de crecimiento folicular y desarrollo del cuerpo lúteo en bovinon	15
Figura 4.1. Variaciones de la producción de embriones <i>in vivo</i> ante los cambios en los niveles de la hormona antimülleriana en hembras Brahman.....	39
Figura 4.2. Variaciones de producción de ovocitos G3 ante los cambios en los de la hormona antimülleriana en hembras Brahman	49

RESUMEN

Con el propósito de evaluar el nivel sérico de la hormona antimülleriana (HAM) como biomarcador en la producción de embriones *in vivo* e *in vitro* en hembras Brahman, se realizó una investigación en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador INIAP, ubicado en la parroquia Pichilingüe, cantón Mocache, Provincia de los Ríos. Se condujeron dos ensayos donde se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos. El Factor A correspondió a la categoría del animal (vaca y vacona) y el Factor B a los niveles de la HAM (150–250 y 250–350 pg/ml), con tres repeticiones. La determinación de HAM en suero sanguíneo se realizó en el laboratorio de Microbiología Unimevet por medio de kits de MOFA®. Para el ensayo *in vitro* se procedió al protocolo de superovulación. Se realizaron análisis descriptivo de las variables, análisis de la varianza, pruebas de promedios y ajustes de regresión. No se encontraron efectos de los niveles de HAM ni de las categorías de las hembras sobre la producción de ovocitos *in vivo* ni sobre la producción de embriones *in vitro*. La producción de embriones *in vivo* se vio favorecida dentro de los niveles séricos de HAM de 250–350 pg/ml, con un promedio de 6,67. Durante el proceso de superovulación, se obtuvo mayor número de ovocitos G3 dentro de los niveles de HAM de 150–250 pg/ml. Las vacas Brahman produjeron mayor número de blastocitos expandidos que las vaconas.

Palabras clave: Superovulación, ovocitos, blastocitos, colecta de embriones, Brahman.

ABSTRACT

In order to evaluate the serum level of antimüllerian hormone (HAM) as biomarker in the production of embryos *in vivo* and *in vitro* in Brahman females, an investigation was made in the National Institute of Agricultural Research of Ecuador INIAP, located in Pichilingüe parish, Mocache canton, Los Ríos Province. Two trials were conducted under a completely randomized design with factorial treatment arrangement. Factor A corresponded to the category of the animal (cow and heifer) and Factor B corresponded to the HAM levels (150-250 and 250-350 ng/ml), with three repetitions. The determination of HAM in blood serum was carried out in the Unimevet Microbiology laboratory by means of MOFA® kits. For the *in vitro* essay was carried out the superovulation protocol. Descriptive analysis of the variables, analysis of the variance, tests of averages and regression adjustments were made. No effects of HAM levels or female categories were found on oocyte production *in vivo* or on *in vitro* embryo production. Embryo production *in vivo* was favored within the serum levels of the antimüllerian hormone of 250-350 ng/ml, with an average of 6.67 embryos. During the superovulation process, a greater number of G3 oocytes cells was obtained within the HAM levels of 150-250 ng/ml. The Brahman cows produced a greater number of expanded blastocysts than the heifers.

Key words: Superovulation, oocytes, blastocysts, embryo collection, Brahman.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En informes recientes se demuestra una asociación positiva entre la hormona antimülleriana (HAM) y la fertilidad en las vacas lecheras (Jiménez *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2014). En un estudio realizado a gran escala en La Florida, E.U.A se explica que las vacas con bajos niveles plasmáticos de HAM tuvieron tasas más bajas de preñez al primer servicio y mayor incidencia de pérdidas de la preñez entre los 30 y 65 días de la gestación (Ribeiro *et al.*, 2014). Por otra parte, las vacas lecheras con niveles plasmáticos relativamente bajos de HAM cuando vaquillonas también presentaron tasas más bajas de supervivencia pos-parto en comparación con compañeras de rodeo de la misma edad que tenían mayores niveles circulantes de HAM (Jiménez *et al.*, 2015).

La hormona antimülleriana es una glicoproteína producida en las células de la granulosa de folículos en crecimiento que se utiliza como marcador sérico para evaluar la respuesta ovárica, debido a que su concentración se ha correlacionado con el número de folículos disponibles, ha demostrado ser un buen marcador endocrino, provee información más confiable que la proporcionada por las mediciones de la hormona folículo estimulante, estradiol e inhibina (González, 2013).

La problemática de la biotecnología reproductiva es que aún es una técnica con alto costo de las hormonas, manejo y mano de obra calificada que la hacen inaccesible para algunos ganaderos, a pesar de ser esta una práctica que permite alta efectividad en la reproducción animal (Hunter, 2003).

Una de las biotecnologías con mayor aportación al mejoramiento genético al hato es la transferencia de embriones; sin embargo, uno de los principales problemas que esta enfrenta es la variabilidad en la respuesta superovulatoria y en la recolección embrionaria entre un animal y otro, lo cual puede estar relacionado a factores externos del medio ambiente o factores extrínsecos del animal mismo,

por ello se ha buscado alternativas que permitan predecir la respuesta de vacas donadoras antes de realizar un tratamiento superovulatorio, ya que el costo del mismo es elevado (Peña y Correa, 2018).

Conocida esta problemática sería importante realizar estudios, que permitan hacer más efectiva a la hembra bovina y con esto se puede estar resolviendo muchas situaciones de infertilidad que traen como consecuencia un descenso en la producción y con esto se provoque la caída de los ingresos del productor Ecuatoriano.

De acuerdo a lo anterior surge la siguiente interrogante: ¿Será que el nivel de hormona antimülleriana como biomarcador hormonal, mejorará la producción de embriones tanto *in vivo* como *in vitro*?

1.2. JUSTIFICACIÓN

En un estudio realizado sobre la relación entre la hormona antimülleriana con la superovulación en vacas, se observó que la HAM está altamente asociada con la respuesta superovulatoria y con el potencial de embriones, llegando a la conclusión de que esta hormona podría convertirse en un método práctico y útil para predecir la respuesta folicular y la capacidad superovulatoria de cada vaca, mejorando la eficiencia de los programas de transferencia de embriones en ovulaciones múltiples en hatos lecheros (Ricárdez *et al.*, 2015).

En bovinos la HAM ha sido propuesta como predictor del número de folículos antrales, de la producción de embriones y se ha determinado la concentración de HAM en ciclo natural y sincronizado (Monniaux *et al.*, 2010; Pfeiffer *et al.*, 2014).

Es posible cuantificar la población folicular del ovario mediante ecografías seriadas, la presencia de elevadas concentraciones de hormona antimülleriana (HAM) se relaciona positivamente con la reserva ovárica, lo que facilita la

evaluación reproductiva del animal, para poder utilizar la HAM en la evaluación de las hembras reproductoras de manera practica en las explotaciones, es necesario conocer otros posibles factores que puedan alterar dicha concentración hormonal (Mossa, 2014).

La utilización de hormona antimülleriana está correlacionada en la población folicular, es decir, a mayor nivel de HAM mayor población folicular, esto representa el punto de partida para conocer el efecto de esta en la producción de embriones (*in vivo* e *in vitro*), lo que traducirá en una alternativa biotecnológica para la reproducción animal.

Por lo antes mencionado esta investigación, se justifica y fundamenta en las distintas ventajas que tiene la producción de embriones a nivel de campo y laboratorio (*in vivo* e *in vitro*), de allí que la literatura y la práctica orienta a los siguientes puntos:

- La posibilidad de obtener embriones a bajo costo para ser utilizados con fines de estudios o propósitos comerciales.
- Aprovechamiento de la vida reproductiva de animales genéticamente valiosos, inmaduros o muy viejos.
- Creación de bancos de gametos.
- Determinación y selección del sexo de embriones.
- Control de enfermedades reproductivas.
- Permite obtener descendientes de hembras de elevada calidad genética que deban ser sacrificadas por padecer enfermedades, infertilidad, por su avanzada edad o durante los programas de erradicación de enfermedades infecciosas (tuberculosis, brucelosis, leucosis).
- Permite el aprovechamiento de animales con determinadas formas de infertilidad: machos con oligospermias severas, hembras con alteraciones estructurales o funcionales del tracto genital.

La producción de embriones *in vivo* ofrece las siguientes ventajas:

- Recuperación del embrión directamente de la hembra en el estadio adecuado.
- Este sistema va asociado siempre a la superovulación intentando obtener elevada tasa ovulatoria para maximizar el número de embriones.
- Permite seleccionar las donadoras según sus reservas foliculares.
- Facilita mejoras en la tasa reproductiva de las hembras aumentando el número de descendientes de mayor valor genético.
- Esta técnica permite obtener embriones de mayor calidad que la *in vitro*
- Los embriones se pueden almacenar casi indefinidamente en condiciones de crío conservación.

Se puede resumir que, la relevancia de la investigación se centrará en conocer el accionar y las consecuencias en el comportamiento reproductivo de las hembras, con el único fin de hacer más rentable el negocio ganadero. Por lo que se hace necesario precisar con mayor detalle la acción posible de la HAM; lo anterior permite plantear la evaluación del nivel de la hormona antimülleriana (HAM) sérica sobre la producción de embriones (in vivo e in vitro).

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el nivel de la hormona antimülleriana (HAM) sérica como biomarcador en la producción de embriones in vivo e in vitro.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de niveles de HAM plasmáticas en hembras bovinas de raza Brahman sobre la producción de ovocitos.
- Valorar el efecto de dos niveles de HAM plasmáticas en hembras bovinas de raza Brahman sobre la producción de embriones (*in vivo* e *in vitro*).
- Estimar el efecto de dos niveles de HAM plasmáticas en hembras bovinas de raza Brahman sobre la superovulación.

1.4. HIPÓTESIS

Si el nivel sérico de la hormona antimülleriana constituye el biomarcador hormonal, se espera que pueda ocurrir mejora en la producción de embriones tanto *in vivo* como *in vitro*.

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS

La ovogénesis comienza en la vida fetal con la división mitótica de las ovogonias. En determinado momento, estas células se transforman en ovocitos y comienzan el proceso de meiosis, el cual permite obtener un óvulo (Callejas, 2001).

Cuando se produce el pico preovulatorio de LH, sólo el ovocito contenido en el folículo preovulatorio reinicia su meiosis hasta el estadio de metafase II, ovocito II, estadio en el cual ovula y permanece así, hasta el momento de la fecundación (Callejas, 2001).

Se debe tener en cuenta que, al momento del nacimiento, todas las hembras mamíferas nacen con gran reserva de ovocitos los cuales declinan rápidamente a medida que se llega a la pubertad (Callejas, 2001).

La foliculogénesis permite obtener un folículo preovulatorio o de DeGraff a partir de folículos primordiales. Este proceso comienza en la vida fetal, en la cual se genera la reserva de folículos primordiales (Callejas, 2001).

2.2. CICLO ESTRAL DEL BOVINO

El ciclo estral se define como el intervalo que existe entre dos estros consecutivos y se caracteriza por cambios conductuales, hormonales y fisiológicos donde se incluyen procesos como foliculogénesis, ovulación y formación del cuerpo lúteo (CL) (Rangel *et al.*, 2010). Durante este proceso ocurren una serie de eventos morfológicos, endócrinos y secretorios en ovarios y genitales tubulares.

2.2.1. ETAPAS DEL CICLO ESTRAL DEL BOVINO

El ciclo reproductivo de la vaca consta de una serie de eventos que ocurren en un orden definido. La duración promedio del ciclo estral es de 21 días (rango entre 17 a 24 días) y la finalidad es preparar el aparato reproductor para el estro y ovulación (Asprón, 2004).

Los principales acontecimientos del ciclo estral se pueden dividir en tres fases: Fase folicular o de regresión lútea (proestro), fase periovulatoria (estro y metaestro), y fase luteal (diestro). El día cero del ciclo estral es considerado como el día que se presenta el celo o estro, signo visible a simple vista. Después le sigue el metaestro, etapa que dura de 3-4 días y en la cual se realiza la ovulación y formación del cuerpo lúteo (CL). Una vez formado el CL, al día del ciclo se inicia el diestro el cual culmina el día 18 con la destrucción del CL, iniciándose de esta manera el próximo ciclo (Larocca *et al.*, 2005).

La cronología señalada es aproximada y varía dependiendo de la duración del ciclo. Los eventos mencionados se basan en un ciclo completo en que no ocurrió la gestación. Si el óvulo es fertilizado y empieza la preñez, el CL no involucre y continúa su función de secretar progesterona; además, de que los folículos no se desarrollan hasta la madurez y no se manifiesta el celo, la progesterona evita contracciones uterinas para tener condiciones favorables para el desarrollo del feto (Asprón, 2004).

2.2.2. CONTROL NEUROENDOCRINO DEL CICLO ESTRAL

El ciclo estral bovino está regulado por una interacción hormonal comandada por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero. Las neuronas del hipotálamo producen la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). Esta hormona difunde a los capilares del sistema porta hipofisario y de aquí a las células de la adenohipófisis, lugar en el cual estimula la síntesis y secreción de la hormona foliculo estimulante (FSH) y luteinizante (LH).

La FSH es la responsable del proceso de estroideogénesis ovárica, crecimiento y maduración folicular y la LH interviene en el proceso de estroideogénesis ovárica, ovulación, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo, estas hormonas son secretadas a la sangre en forma de pulsos y son reguladas por el sistema tónico y el cíclico (Callejas, 2001).

El sistema tónico produce el nivel basal circulante de las hormonas hipofisiarias, las que promueven el desarrollo de los elementos germinales y endocrinos de las gónadas. El sistema cíclico actúa por sólo 12 a 24 h en cada ciclo estral, y tiene por función primaria provocar la ovulación. La neurohipófisis, parte posterior de la hipófisis, produce oxitocina. Esta hormona tiene varias funciones, dentro del ciclo estral y por ejemplo, interviene en el proceso de luteólisis (Callejas, 2001).

En los ovarios se produce progesterona, estrógeno e inhibina. Los estrógenos son producidos por el folículo ovárico y tienen acción sobre diferentes órganos como son las trompas de Falopio, útero, vagina, vulva y el sistema nervioso central, en el cual estimulan la conducta del celo y, en el hipotálamo ejercen retroalimentación negativa en el centro tónico y retroalimentación positiva en el centro cíclico (Callejas, 2001).

La progesterona es producida por el cuerpo lúteo por acción de la hormona luteinizante. Esta hormona prepara el útero para la implantación del embrión y genera el ambiente apropiado para mantener la gestación. En cuanto al control del ciclo estral, la progesterona ejerce retroalimentación negativa sobre el centro tónico (Callejas, 2001).

El útero produce prostaglandina $F2\alpha$, hormona que interviene en la regulación del ciclo estral por su efecto luteolítico; a su vez, interviene en los mecanismos de la ovulación y el parto, como mencionado por Callejas (2001) (Figura 2.1).

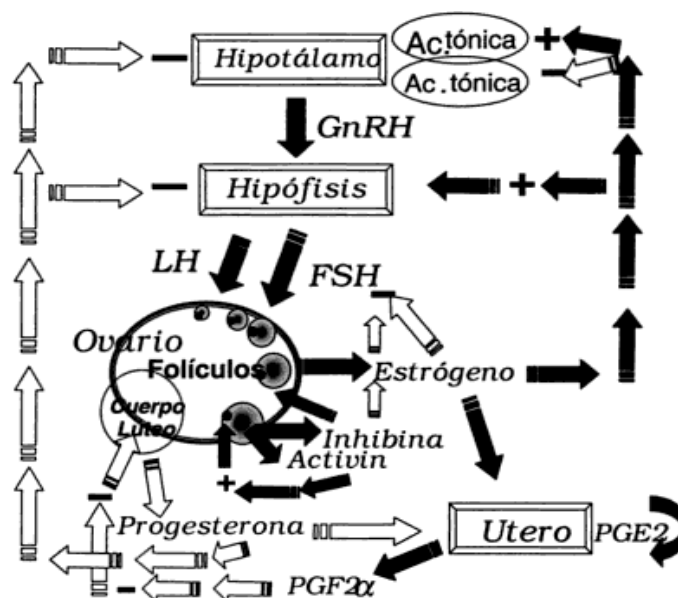


Figura 2.1. Interacciones hormonales del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario-Útero (Callejas, 2011)

2.2.3. HORMONAS QUE INTERVIENE EN EL CICLO ESTRAL

Una de las herramientas más utilizadas para el control del anestro postparto en climas tropicales ha sido el uso de hormonas; sin embargo, es importante recordar que el uso de los tratamientos hormonales en estos sistemas siempre debe ser secundario a los planes de mejoramiento general, como el manejo, la alimentación y la sanidad (Gutiérrez, 2008).

2.2.3.1. HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH)

La GnRH es secretada por el hipotálamo, es un péptido pequeño de diez bases de aminoácidos, que está encargado de estimular a la glándula hipófisis para que secrete las hormonas gonadotrofinas FSH y LH, juega un importante papel en el proestro, durante el ciclo estral la GnRH se secreta en pulsos cuya frecuencia cambia según el estadio del ciclo estral y está relacionada con los cambios de las concentraciones de los esteroides ováricos (Navil, 2007)

Existen dos clases de análogos de GnRH, los análogos antagonistas parecen unirse al receptor en la hipófisis, pero no induce la liberación de LH o FSH, y bloquean la acción de la hormona natural, los análogos estimuladores inducen

la liberación de LH y FSH, al igual que la GnRH natural, la razón del aumento en la actividad biológica de los agonistas GnRH se debe a su capacidad de permanecer unidos al receptor en la hipófisis por más tiempo que la hormona natural (Navil, 2007).

2.2.3.2. HORMONAS GONADOTRÓPICAS O GONADOTROPINAS

Son glicoproteínas producidas y liberadas por la hipófisis anterior, de donde se vierten al torrente sanguíneo, para así alcanzar su órgano objetivo: las gónadas (ovarios); también favorecen la maduración gonadal y la esteroidogénesis, capacitando al organismo para que se pueda reproducir, la síntesis y la liberación de las hormonas gonadotrópicas hipofisarias, las cuales son reguladas por la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (GnRH), la misma que provee el enlace entre los sistemas nervioso y endocrino (Prieto y Velásquez, 2002).

La hormona luteinizante (LH) es una hormona producida en la hipófisis, su vida media es de 30 minutos, los niveles tónicos o basales de LH actúan con la FSH para inducir la secreción de estrógenos de los folículos ováricos: Las células de la teca interna, contiene receptores de LH y mediante su estímulo producen andrógenos, que pasan a las células de la granulosa, donde mediante la acción de la FSH induce aromatización de estos andrógenos para transformarse en estrógenos que son liberados al antro folicular y de allí a la circulación general (Asprón, 2004).

La LH es también responsable de inducir una serie de reacciones enzimáticas que terminan con la ruptura de la pared folicular y la ovulación y por efecto da origen al cuerpo lúteo, mismo que empieza a secretar progesterona, hormona indispensable en la gestación (Asprón, 2004).

La hormona folículo estimulante (FSH) es una hormona gonadotrópica, de naturaleza glicoprotéica producida por el lóbulo anterior de la glándula hipófisis,

la vida media de esta hormona oscila entre 2 a 5 horas, en la hembra estimula el crecimiento, desarrollo y función del folículo en los ovarios para que, de esta manera, el óvulo o huevo se encuentre disponible para la fertilización. La FSH, en conjunto con la LH estimula la síntesis de estradiol e inhibina en las células teca de los folículos en desarrollo, que a su vez actuarán en conjunto suprimiendo la liberación de FSH por la hipófisis (Peters *et al.*, 2004).

2.2.3.3. HORMONAS GONADALES

Algunas de las hormonas producidas en los ovarios son: los estrógenos y la progesterona, clasificadas ambas como esteroides. Los estrógenos estimulan la actividad en el sistema reproductivo, mientras que la progesterona inhibe dicha actividad (Reeves, 2010).

Los estrógenos alcanzan su mayor nivel en el estro, son hormonas esteroideas producidas por el folículo ovárico y tienen acciones sobre los distintos órganos en los que intervienen, como son: las trompas de Falopio, el útero, la vagina, la vulva, el sistema nervioso central en el cual estimulan la conducta de celo y el hipotálamo donde ejercen un "feed back" negativo sobre el centro tónico y positivo sobre el centro cíclico (Sintex, 2005).

Los estrógenos son producidos por las células de la pared del folículo en crecimiento en el ovario bajo el control de la LH, el folículo preovulatorio, justamente antes de la ruptura, produce grandes cantidades de estrógenos, el elevado nivel de estrógenos hace que la vaca muestre signos de estro (Echeverrías, 2006).

Las células de la teca y granulosa encontradas dentro y alrededor del folículo en crecimiento actúan en conjunto para la producción de estrógenos, las células de la teca producen andrógenos que se difunden dentro de las células de la granulosa donde son convertidos en estrógenos, después de la ruptura, las células de la granulosa se convierten en células luteales grandes, formando las

principales células de secreción de progesterona del cuerpo lúteo (Martínez, 2005).

Los estrógenos tienen varios efectos: 1) desarrollo y función de los órganos sexuales secundarios, 2) receptividad sexual o conducta estral, 3) ritmo y tipo de crecimiento, especialmente depósito de grasa, y 4) preparación de la vaquilla prepúber y la vaca posparto para el inicio de la actividad sexual cíclica (Asprón, 2004). Además, dilatan el cuello del útero, favorecen la contractilidad de la musculatura uterina y generan cambios en la viscosidad del moco cervical, base para la detección del estro, el estrógeno de primera importancia en la hembra es el estradiol- 17 β , pequeñas cantidades de estrona y estriol son también secretados por diferentes partes del ovario (Echeverrías, 2006).

Progesterona esta hormona esteroidea, es sintetizada por el cuerpo lúteo, la placenta y las glándulas adrenales, su secreción es principalmente estimulada por acción de la LH, aunque también se ha visto que participan la FSH, factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1) y las prostaglandinas E2 e I2, se produce en mayor cantidad durante el metaestro y el diestro y se sintetiza durante todo el período de gestación (Sintex, 2005).

La P4 suprime el desarrollo completo de los folículos y la secreción de estrógenos, niveles altos de esta hormona y bajos de estrógenos evitan que la vaca presente estro, las funciones de estrógenos y progesterona no siempre son antagónicas y en algunos procesos actúan juntas, el ratio de concentración estrógenos/progesterona determina el inicio y duración de la conducta estral, el desarrollo uterino es iniciado por los estrógenos y completado por la progesterona (Asprón, 2004).

2.2.4. PROSTAGLANDINA F2 α

La prostaglandina F2 α es producida por el miometrio, interviene en la regulación neuroendócrina del ciclo estral mediante su efecto luteolítico (de regresión del

cuerpo lúteo) y la liberación de oxitocina, cumple además funciones de regulación de los mecanismos de ovulación, sus concentraciones sanguíneas son bajas, pero se elevan en ciertas condiciones como en el parto, las prostaglandinas actúan como hormonas autocrinas y paracrinas (Salverson *et al.*, 2002).

Las prostaglandinas se pueden sintetizar a partir del ácido araquidónico por la acción de diferentes enzimas como ciclooxigenasas, lipoxigenasas, el citocromo P-450, peroxidasas, etc., el mecanismo por medio del cual la PGF-2 α llega del endometrio al ovario en los rumiantes es único, ya que al ser liposoluble se difunde desde las paredes de la vena utero-ovarica para la arteria ovárica (Adams, 2001).

2.2.5. REGULADORES PEPTÍDICOS

Los reguladores peptídicos son producidos en la teca y en la granulosa, tienen por finalidad potenciar los resultados de las gonadotropinas en la granulosa del folículo prenatal, son glicoproteínas con acción auto, para y endocrina (Martínez, 2005).

Inhibina, hormona proteica, coadyuvante, producida por las células de Sertoli en el macho y las de la granulosa en la hembra, interviene en el mecanismo de regulación de la secreción de FSH, ejerciendo un feed-back negativo a nivel hipofisiario sobre el estradiol, lo que conduce a la disminución en la secreción de FSH. Al final de la fase lútea disminuyen las cantidades de estradiol–inhibina y nuevamente aumenta la FSH para comenzar el reclutamiento de folículos para los ciclos venideros (Sintex, 2005).

Actina, coadyuvante de la acción de la FSH y antagonista natural de la inhibina, tiene acción autocrina bien definida y estimulante sobre el proceso de aromatización (Sintex, 2005).

2.3. DINÁMICA FOLICULAR

La dinámica folicular puede definirse como el proceso continuo de crecimiento y regresión de folículos antrales que conlleva al desarrollo del folículo preovulatorio (Lucy *et al.*, 1992). En las hembras bovinas, la dinámica folicular ocurre en forma de ondas, siendo descritas dos o tres ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral. Al inicio de este, una cohorte de folículos es reclutado del grupo de folículos antrales más pequeños de 2 a 4 mm (Borges *et al.*, 2001).

El reclutamiento no es un fenómeno aislado o al azar, al parecer los folículos al ser reclutados como grupo o cohorte han recibido anteriormente una señal que les permite crecer y desarrollarse en vez de sufrir regresión. La señal que estimula el reclutamiento parece ser una ligera elevación de FSH en plasma (Fortune, 1994), aunque no se conocen claramente los factores involucrados en el desarrollo final de los folículos preovulatorios; aunque, si se conoce que la ovulación del primer folículo dominante puede inducirse mediante la administración de un análogo de GnRH (Crowe *et al.*, 1993).

El final de la fase de selección se define, en la vaca, como el momento cuando un folículo (dominante) activo estrogénicamente, promueve su propio crecimiento e inhibe el crecimiento de otros folículos (Sunderland *et al.*, 1994). Si la regresión del cuerpo lúteo ocurre durante el crecimiento o la fase temprana de la dominancia, el folículo dominante, libre del medio hormonal restrictivo impuesto por la progesterona sobre el hipotálamo y la hipófisis, continuará su desarrollo hasta alcanzar la talla de un folículo ovulatorio y eventualmente se disparará la cascada que conduce a la ovulación (Webb *et al.*, 1999).

En la Figura 2.2 se presenta el modelo esquemático de las ondas del crecimiento folicular y desarrollo del cuerpo lúteo en bovino planteado por Rosales y Guzmán (2012).

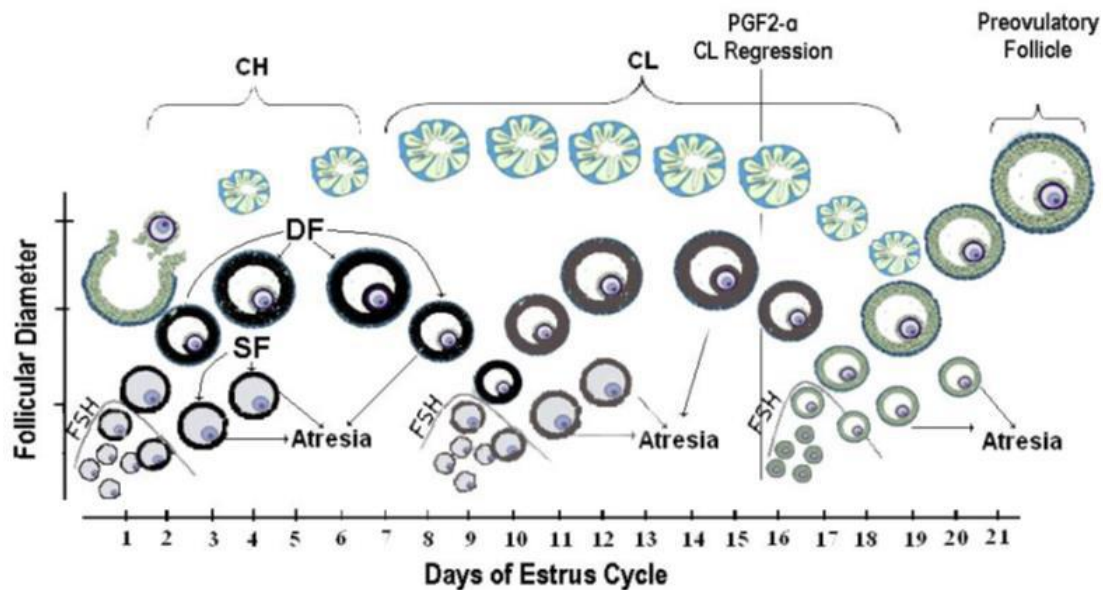


Figura 2.2. Modelo esquemático de las ondas de crecimiento folicular y desarrollo del cuerpo lúteo en bovino (Rosales y Gusman, 2011)

2.3.1. DINÁMICA FOLICULAR DURANTE EL CICLO ESTRAL

Durante un ciclo estral las vacas Brahman pueden desarrollar una (6,7%), dos (90,0%) o tres (3,3%) ondas foliculares (OFs), la variación en el número de OFs también fue observada en hembras Gyr multíparas que desarrollaron dos (6,6%), tres (60,0%), cuatro (26,6%) o cinco (6,6%) OFs por ciclo. En vacas Cebú mestizas durante el primer ciclo estral posparto que formaron una (16,5%), dos (67%) o tres (16,5%) OFs por ciclo; mientras que en vacas Guzerá multíparas con dos (37,5%), tres (50%) o cuatro (12,5%) OFs por ciclo (Henao, 2010).

2.4. CRECIMIENTO FOLICULAR

Los ovocitos presentes en el ovario adulto se originan de un número definitivo de células germinales primordiales derivadas de la masa celular interna del blastocisto en desarrollo, en los mamíferos, la hembra cuenta con una reserva de ovocitos que han interrumpido su crecimiento en los folículos primordiales, única fuente de ovocitos para ser ovulados durante su vida reproductiva, los

folículos primordiales se forman durante la vida fetal en bovinos (130 días) (Espinoza *et al.*, 2007).

El desarrollo folicular se puede dividir en tres etapas: la activación de los folículos primordiales, la transición a folículos secundarios y el desarrollo de los folículos secundarios a la etapa periantral (Fortune, 2003).

A partir de estudios *in vitro* se ha demostrado que la activación de folículos primordiales en el ganado vacuno se produce sin el agregado de factores de crecimiento y hormonas; también, se comprobó que existen factores inhibitorios para la salida gradual de folículos del pool de descanso (Fortune, 2003).

Los folículos se forman cuando los ovocitos primarios están envueltos por una sola capa de células de la granulosa aplanadas. En el ganado bovino, la formación de los folículos se produce durante la vida fetal, esta formación no se produce de manera sincrónica sino que el ovario fetal contiene folículos preantrales y antrales tempranos. La transición de folículos primordiales a la etapa primaria puede ser muy prolongada. La etapa secundaria comienza con el desarrollo de una segunda capa de células granulosas, progresa a través de la adición de hasta seis o siete capas de células y termina con el desarrollo gradual de una cavidad antral (Fortune, 2003).

2.5. SUPEROVULACIÓN

El objetivo de la transferencia de embriones es obtener a partir de progenitores de alto valor genético el mayor número posible de descendientes utilizando el útero de receptoras de menor valor económico para llevar la gestación a término. Para llegar a producir un número elevado de descendientes con alto valor genético, debe generarse en la hembra donante una estimulación ovárica adecuada mediante la administración de gonadotrofinas (Callejas, 2001).

Existen muchos protocolos de superovulación para bovinos, los cuales varían en tiempo, cantidad de dosis y manejo de los animales. Al seguir con las indicaciones de los protocolos se debe tener la mayor disposición y responsabilidad, ya que un simple error en cualquier fase del proceso, afectaría la respuesta al tratamiento hormonal suministrado (Orellana *et al.*, 2007).

La superovulación es considerada como una técnica sumamente importante para obtener varios embriones de una excelente donadora; sin embargo, la gran variabilidad en la respuesta individual al tratamiento de superovulación, ha sido un factor limitante que afecta la eficiencia en la producción embrionaria (Tonhati *et al.*, 1999).

2.5.1. FACTORES QUE ALTERAN LOS RESULTADOS DE LOS PROTOCOLOS SUPEROVULATORIOS

Los factores que afectan la respuesta superovulatoria se pueden clasificar en intrínsecos tales como estado nutricional, historia reproductiva, edad, raza, etc., y en extrínsecos entre los que se encuentran pureza y dosis de la hormona utilizada, vía y lugar de aplicación, frecuencia y época del año, entre otros (Mapletoft *et al.*, 2000).

La literatura consultada reporta antecedentes de cada uno de estos factores los cuales se detallan a continuación:

- **Estado nutricional:** La nutrición inadecuada afecta la función reproductiva en la mayoría de los mamíferos (Murphy y Martinuk, 1991); además, se demostró que el consumo de una dieta baja en energía reduce el diámetro del folículo dominante y acorta su persistencia en el ovario. La condición óptima para las donadoras es una condición corporal entre 3.0 y 4.0 sobre un valor máximo de 5.0, determinando unas condiciones nutricionales adecuadas, como el nivel de energía en la ración, el que influye en las tasas de ovulación, fecundación y viabilidad de embriones (Vizueté, 2012).

- **Historia reproductiva:** Representa un factor sumamente importante que los animales cuenten con antecedentes reproductivos favorables, ya que se ha observado claramente que las donantes que ingresan a los programas de transferencia embrionaria con antecedentes de infertilidad, tienen menor producción que aquellas consideradas sanas (Cutini *et al.*, 2000).

- **Edad:** En un estudio realizado por (Hasler y Thatcher, 1999) se reportó que la edad de la donadora resultó un factor sumamente importante en la respuesta superovulatoria, ya que se observó mejor respuesta en vacas menores de diez años, en contraste con las mayores a esta edad. En otro estudio no se encontró efecto de la edad sobre el número total de embriones recuperados hasta los nueve años de edad, aunque, posteriormente se observó reducción en el número de folículos (Donaldson, 1984). Recientemente (Malhi *et al.*, (2005) reportaron que las células de los ovocitos y la cantidad de embriones transferibles es menor en vacas viejas que en vacas jóvenes.

- **Raza:** Se sabe que existen diferencias en la fisiología reproductiva de bovinos de las razas *Bos taurus* y *Bos indicus*. Se ha reportado que las razas *Bos indicus* poseen mayor número de folículos por onda folicular (Carvalho *et al.*, 2008). En un estudio retrospectivo hecho en donantes de razas lecheras y productoras de carne, se observó en la raza Jersey mayor proporción de donantes con respuesta ovárica excesiva, sin aumentar el número de embriones transferibles/recolección (Holm *et al.*, 1987).

- **Hormonas utilizadas:** Existe una extensa variabilidad de productos utilizados para inducir ovulación múltiple en bovinos, en los cuales las preparaciones hormonales influyen directamente en la respuesta superovulatoria de cada donadora de embriones (Kanitz *et al.*, 2002). La inducción a la superovulación se efectúa principalmente con gonadotrofina sérica de yegua preñada (PMSG) o con extractos de pituitaria porcina que generalmente se conocen como FSH-p, a pesar de que en muchos casos contienen mayor cantidad de hormona luteinizante (LH) que de hormona folículo estimulante (FSH-p) (Duica *et al.*,

2007). Se ha reportado que cuando se utilizan extractos de pituitaria purificados, con baja contaminación de LH, mejora la respuesta superovulatoria en el ganado bovino (Mapletoft *et al.*, 2002).

- **Época:** Los estudios realizados teniendo en cuenta el efecto de la época del año sobre la respuesta a la superovulación, han presentado resultados contradictorios (Hasler y Thatcher, 1999; Church, 1993). En un trabajo más reciente, donde se analizaron datos de manera retrospectiva para comparar la influencia de la estación sobre la producción de embriones, se detectó que en las estaciones de invierno y primavera fue más favorable para producir mayor número de embriones transferibles (Ochoa *et al.*, 2009); además, durante los meses de verano, se produce estrés térmico en las vacas Holstein afectando su respuesta superovulatoria y la calidad de los embriones (Sartori *et al.*, 2002).

2.6. POBLACIÓN DE FOLÍCULOS ANTRALES Y LA HORMONA ANTIMULLERIANA EN EMBRIONES *IN VITRO* O *IN VIVO*

El tamaño de la población folicular ovárica evaluada por conteo o por medio de marcadores endócrinos puede ser útil para predecir el éxito de biotecnologías reproductivas en el ganado; sin embargo, es altamente repetible dentro del mismo animal la población folicular antral (PFA) parece ser en gran medida variable en distintos individuos. Por lo tanto, los métodos de laboratorio que puedan predecir de manera confiable la PFA podrían tener un valor significativo para seleccionar vacas donantes para la biotecnología reproductiva, y también, para aplicar la selección genómica para identificar a los animales con mayor potencial reproductivo (Durlinger *et al.*, 2002).

Observar la relación de niveles circulantes de HAM y la población folicular, permite identificar a esta hormona como un importante marcador de la respuesta endocrina a la superovulación y la producción de embriones *in vitro* en bovinos. En hembras, la HAM es producida por las células de la granulosa, principalmente de folículos pre-antrales y antrales tempranos (Durlinger *et al.*, 2002). La HAM

se ha correlacionado con la población folicular antral (PFA) en el ganado de diferentes categorías (Batista *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2014).

Por otra parte, los niveles plasmáticos de HAM parecen variar significativamente entre razas de ganado siguiendo el patrón en términos de población de folículos antrales (Batista *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2014) y parece que hay un umbral para HAM diferente para grupos genéticos diferentes cuando se trata de clasificar a los animales en clases según su población de folículos antrales (Batista *et al.*, 2014). Por ejemplo, cuando las vaquillonas dentro de un grupo genético se clasificaron en baja o alta población folicular antral, el umbral de la HAM para dividir en clases las vacas *Bos indicus* fue mayor en comparación con ese mismo umbral en vaquillonas *Bos taurus* (Batista *et al.*, 2014).

Una ventaja práctica importante en la utilización de HAM en lugar del conteo directo de folículos con ultrasonido para predecir la PFA es que los niveles de HAM varían mínimamente durante el ciclo estral (Ireland *et al.*, 2008; Rico *et al.*, 2009, Souza *et al.*, 2015) por lo tanto, las muestras de sangre se pueden tomar en cualquier momento del mismo para evaluar niveles plasmáticos de HAM (Batista *et al.*, 2014). La única excepción sería el período después de los tratamientos de superestimulación con FSH, cuando los niveles plasmáticos de HAM son mayores que los niveles fisiológicos normales.

2.7. HORMONA ANTIMULLERIANA

Kawamata (1994) define la hormona antimülleriana (HAM) como una glicoproteína que pertenece a los factores de transformación beta y la familia del factor de crecimiento, la cual es producida por células de la granulosa de folículos en crecimiento sanos, su peso molecular es de 140 KDa.

La HAM se expresa en células de la granulosa de folículos en crecimiento en el ovario. La HAM en hembras es producida por las células granulosas de los folículos preantrales (primarios y secundarios) y antrales pequeños. Esta hormona actúa inhibiendo el reclutamiento de los folículos primarios, así como

también en la fase de crecimiento folicular dependiente de FSH. Al expresarse exclusivamente en las células granulosas de los folículos no seleccionados, se convierte en un candidato ideal para representar tanto la cantidad como la calidad del conjunto de folículos ováricos (Rico *et al.*, 2009).

En la actualidad, la HAM es el mejor marcador endócrino de la reserva folicular ovárica y de respuesta al tratamiento de estimulación ovárica en humanos (Grujters *et al.*, 2003). Recientemente se ha demostrado que las concentraciones de HAM pueden predecir la población folicular y el número de ovocitos en vacas y vaquillas (Ireland *et al.*, 2007), y que las concentraciones de HAM en suero antes de la superovulación están altamente correlacionadas con el número de ovulaciones después del tratamiento (Rico *et al.*, 2009).

A pesar de la importancia de la HAM como un marcador endócrino de las poblaciones de folículos en crecimiento en todas las especies estudiadas, se sabe poco sobre la regulación de su expresión y la producción (Rico *et al.*, 2009).

La expresión de HAM se ha demostrado que es más alta en las células de la granulosa de folículos antrales, preantrales y pequeños, y disminuye durante el crecimiento folicular en la fase terminal y atresia, en la vaca (Rico *et al.*, 2009). Las bajas concentraciones de HAM se han encontrado en el líquido folicular de grandes folículos antrales y preovulatorios estrogénicos (Monniaux *et al.*, 2008; Rico *et al.*, 2009).

2.8. POBLACIÓN DE FOLÍCULOS ANTRALES Y LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA EN EMBRIONES *IN VITRO* O EN *VIVO*

En hembras, la HAM es producida por las células de la granulosa, principalmente de folículos pre-antrales y antrales tempranos. La HAM se ha correlacionado con la población folicular antral en el ganado de diferentes categorías (Durlinger *et al.*, 2002).

Por otra parte, los niveles plasmáticos de HAM parecen variar significativamente entre razas de ganado siguiendo el patrón en términos de PFA (Batista *et al.*, 2014, Ribeiro *et al.*, 2014) y parece que hay un umbral para HAM diferente para grupos genéticos diferentes cuando se trata de clasificar a los animales en clases según su PFA (Batista *et al.*, 2014). Por ejemplo, cuando las vaquillonas dentro de un grupo genético se clasificaron en una baja o alta población folicular antral, el umbral de la HAM para dividir en clases las vacas *Bos indicus* fue mayor en comparación con ese mismo umbral en vaquillonas *Bos taurus* (Batista *et al.*, 2014).

Una ventaja práctica importante en la utilización de HAM en lugar del conteo directo de folículos con ultrasonido para predecir la PFA es que los niveles de HAM varían mínimamente durante el ciclo estral (Ireland *et al.*, 2011), por lo tanto, las muestras de sangre se pueden tomar en cualquier momento del mismo para evaluar niveles plasmáticos de HAM (Batista *et al.*, 2014).

2.9. MEDICIÓN DE NIVELES DE LA HORMONA ANTIMÜLLERIANA – TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO ELISA

Una de las técnicas utilizadas para determinar concentraciones de hormonas es la técnica de ELISA. Existen diversas variaciones de la técnica de ELISA, pero la más utilizada es la denominada ELISA en sándwich la cual utiliza dos anticuerpos reactivos con diferentes epitopes del antígeno cuya concentración se desea determinar (Abbas *et al.*, 2012).

Gracias al clonado del gen HAM, fue posible desarrollar importantes herramientas para el estudio de la fisiología y la fisiopatología gonadales, la obtención de HAM recombinante y de anticuerpos monoclonales específicos permitió el desarrollo de tres inmunoensayos de tipo ELISA en 1990, dichos ensayos eran de uso limitado a los laboratorios que los desarrollaron en Francia, los Estados Unidos y Australia (Rey *et al.*, 2013)

Rey *et al.* (2013) señalan que recientemente, la empresa Beckman-Coulter ha descontinuado la comercialización del kit DSL y, si bien continúa comercializando el kit Immunotech, desde 2009 se está reemplazando progresivamente por una versión de nueva generación conocida como HAM Gen II, existe buena correlación entre el ELISA Gen II y los previos (R^2 0,971 con Immunotech y 0,930 con DSL).

Si bien los ensayos empleados para medir la HAM parecen ser bastante confiables, existen cuidados recomendables en cuanto a la toma y conservación de la muestra, es conveniente centrifugar la muestra de sangre y separar el plasma o el suero y congelar de manera inmediata, la presencia de anticuerpos heterófilos, por ejemplo, en pacientes con enfermedades autoinmunes, puede provocar resultados falsamente elevados en la determinación de HAM sérica, recientemente, se ha validado la utilidad de la cuantificación de HAM en gota de sangre seca, en papel de filtro como método mínimamente invasivo para la evaluación de la reserva ovárica (Rey *et al.*, 2013).

2.10. ULTRASONIDO EN EL CONTEO FOLÍCULAR

La ultrasonografía o ecografía es una técnica que permite la visualización de los órganos internos, su aplicación en bovinos y equinos a partir de la década del 80 ha sido uno de los pasos más importantes para el estudio y comprensión de los eventos normales que ocurren durante el ciclo estral y la gestación (Bo y Caccia, 2000).

La ecografía se utiliza comúnmente para examinar y evaluar el tracto reproductivo bovino. La ecografía transrectal se realiza a través de la introducción del transductor (sonda) en el recto en contacto con la cara ventral del recto contra el piso de la pelvis. Permitiendo identificar las estructuras reproductivas internas y evaluar de forma sistemática, incluyendo los ovarios, los cuernos, cuerpo y cuello uterino y la vagina (Paigrave, 2012).

En la actualidad, el recuento de folículos antrales por ecografía ovárica es una manera de seleccionar buenas donantes de embriones, pero esta técnica requiere de personal entrenado y de un equipamiento especializado (Monniaux *et al.*, 2010).

2.11. ASPIRADO FOLÍCULAR

La técnica de aspiración folicular in vivo u ovum pick up (OPU) consiste en la recolección de ovocitos con ayuda de una aguja introducida por la vagina mediante la punción de los folículos visualizados a través de un ecógrafo en hembras vivas (Bage *et al.*, 2003).

Se recomienda la aspiración de todos los folículos mayores de 5 mm, lo cual se logra a partir de la ultrasonografía por vía transvaginal observándose el crecimiento sincrónico de una nueva onda folicular 1,5 días postaspiración (Denis, 2000).

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

La presente investigación se realizó en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador INIAP, en la estación experimental tropical Pichilingüe (EETP-INIAP), ubicada en el km 5 vía Quevedo–Empalme de la parroquia Pichilingüe, cantón Mocache de la Provincia de los Ríos. Cuenta con una superficie de 1.200 hectáreas y su ubicación geográfica corresponde entre las coordenadas 01°06' LS y 79°29' LO, a la altitud de 75 m.

La Estación está orientada a la investigación y desarrollo de programas agropecuarios, programa de ganadería (especies de Brahman, Holstein y cruza) de carne y leche; además, con un núcleo de apoyo y capacitación de transferencia de tecnológica.

3.2. CONDICIONES CLIMÁTICAS

La región se caracteriza por un clima tropical monzón caluroso, bosque semi-húmedo tropical y estación seca entre junio a noviembre. En el Cuadro 3.1 se presentan los parámetros climáticos promedios de los últimos cinco años.

Tabla 3.1. Condiciones Climáticas de la estación experimental INIAP-Pichilingüe

PARÁMETROS	PROMEDIOS
Precipitación media anual (mm)	2223,85
Temperatura media anual (°C)	25,47
Humedad relativa anual (%)	85,84
Heliofanía anual (horas/sol)	898,66

Fuente: INIAP-Pichilingüe (2019).

3.3. DURACIÓN DEL TRABAJO

El trabajo de campo se condujo durante seis meses, donde se incluyó la selección de los animales, análisis de laboratorio (determinación de niveles de

HAM), producción de embriones in vitro e in vivo, hasta el procesamiento de datos y el análisis estadístico respectivo.

3. 4. FACTORES EN ESTUDIO

- Niveles de la hormona antimülleriana.
- Categoría de la hembra bovina

3. 5. TRATAMIENTOS

En el Cuadro 3.2 se presenta el listado de tratamientos derivados de las combinaciones de los factores en estudio.

Tabla 3.2. Listado de tratamientos evaluados

Tratamientos	Descripción
1	Vaonas – Nivel HAM bajo
2	Vacas – Nivel HAM bajo
3	Vaonas – Nivel HAM alto
4	Vacas – Nivel HAM alto

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se organizó la investigación en un diseño completamente al azar con un arreglo de tratamientos factorial (2x2), siendo el factor A la categoría del animal (vaca y vacona) y el factor B los niveles de la HAM (alto y bajo), para un total de cuatro tratamientos con tres repeticiones. El modelo matemático que se utilizó fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_j + \beta_k + (\alpha\beta)_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ij} = Respuesta al i-ésimo nivel del factor A y j-ésimo nivel de factor B

μ = Media poblacional

α = Efecto del i-esimo Factor A (categoría del animal) i=1 y 2

β = Efecto de la j-esima Factor B (Niveles de HAM) j=1 y 2

$\alpha\beta$ = Efecto de la interacción entre los factores A y B
 ε = Error experimental con media y varianza común

El esquema del análisis de varianza estará estructurado de acuerdo a lo indicado en el Cuadro 3.3.

Tabla 3.3. Esquema de Análisis de Varianza

Fuentes de variación	Grados de libertad
Tratamientos	3
Error experimental	8
Factor A (Categoría del animal; CA)	1
Factor B (Niveles de la hormona; NH)	1
Interacción entre factores (CA x NH)	1
Total	11

3.7. UNIDAD EXPERIMENTAL

Se utilizó tres animales por tratamiento, para un total de 12 animales, distribuidos en seis por categoría de hembra bovina (vaconas y vacas), con una homogeneidad en la condición corporal y edad; cada animal correspondió a una unidad experimental.

3.8. VARIABLES MEDIDAS

- Número de ovocitos aspirados
- Número de ovocitos madurados
- Número de producción de blastocistos *in vitro*
- Número de producción de embriones *in vitro*
- Respuesta superovulatoria (conteo de cuerpo lúteos)
- Número de embriones *in vivo*
- Calidad de embriones.

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis estadístico descriptivo, para evaluar la variabilidad de las observaciones, considerando como descriptores las medidas de tendencia central (media y mediana) y dispersión (varianza, desviación estándar y coeficiente de variación, así como también los intervalos de confianza para la media al 95% de confianza.

Previo al análisis de varianza los datos estadísticos fueron evaluados por la Prueba de F para homogeneidad de varianza y la Prueba Shapiro-Wilks para normalidad de los errores. La no adecuación de los datos por transformaciones tanto para la homogeneidad como para la normalidad, respectivamente, condujo a la aplicación de estadística no paramétrica, particularmente la técnica de Kruskal-Wallis. Las comparaciones de medianas se realizaron por la prueba de mínima diferencia significativa a 95% de confianza. Similarmente, en aquellos casos donde se obtuvieron diferencias significativas para los niveles de HAM, se procedió a explorar las relaciones causa – efecto entre las variables involucradas a través de ajustes de regresión. Todos los análisis estadísticos se efectuaron con el software InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2017).

3.10. PROCEDIMIENTO

3.10.1. MÉTODOS Y TÉCNICAS

Se utilizó la técnica de ultrasonografía a través de un ecógrafo por medio de la punción de folículos por vía intravaginal, para así determinar los distintos parámetros que se midieron.

Además, se seleccionó los animales de acuerdo a los distintos niveles de concentración HAM en dos grupos un alto valor de HAM >300 pg/ml en sangre (Grupo 1; T1), y un bajo valor de HAM <300 pg/ml en sangre (Grupo 2; T2).

3.10.2. MANEJO DEL EXPERIMENTO

Los animales experimentales fueron sometidos a colección de muestras de sangre (4 ml) para los análisis de la HAM, que fueron obtenidas por punción de la yugular, empleando tubos al vacío con heparina de sodio (BD Vacutainer® NH; Becton Dickinson and Co.). Las muestras de sangre fueron procesadas en el laboratorio de Microbiología Unimevet donde se las sometió a centrifugación refrigerada (3200 g por 10 minutos a 4° C) y almacenadas inmediatamente a -20° C hasta su posterior análisis por ELISA.

Se efectuó una prueba de ELISA para determinación de HAM en suero sanguíneo por medio de kits de MOFA® para muestras de bovino (HAM ELISA simple test Kit Bovine Serum, 40 samples Max/Kit 21700/100) y el lector "Infinite 200 PRO Multimode Multiplate Reader". Las concentraciones de HAM fueron medidas en muestras de 50 µL de suero.

Las muestras de suero fueron descongeladas en baño de maría justo antes de la prueba de ELISA, sometidas a sacudido en vortex y centrifugadas a 3,200 g por 10 minutos a 4°C. Seguidamente, las muestras se incubaron por 12 horas a 4°C en presencia de un primer anticuerpo, luego por 1,5 horas a temperatura ambiente en presencia del segundo anticuerpo para inmediatamente hacer las lecturas.

Posterior al muestreo se determinaron los niveles plasmáticos de HAM en suero sanguíneo, donde se conformaron dos grupos, grupo 1 con nivel alto HAM (250 – 350 pg/ml) y grupo 2 un nivel bajo de HAM (150 – 250 pg/ml).

Las donadoras fueron revisadas para asegurar que no tengan problemas reproductivos, se encontraban cíclicas, con características genéticas superiores y condición corporal (CC) 2,75-3, determinación que se hizo mediante observación. Después de haber seleccionado las donadoras, se procedió a la aspiración folicular que se realizó de la siguiente forma:

Los animales fueron introducidos a la manga de trabajo, donde se procedió a lavar el tren posterior del animal, se aplicó xilocaína al 2% aproximadamente entre 4-5 ml por animal vía epidural baja, posteriormente se realizó ecografía de diagnóstico ovárico, con respecto a su dinámica folicular, luego con la utilización de una sonda sectorial y una guía de aspiración folicular introducida vía intravaginal, y con otra mano introducida por el recto, con esa mano acercando el ovario a la pared craneal de la vagina, mediante el ecógrafo fue guiada la aspiración de los folículos desde 2 mm en adelante utilizando una bomba de vacío de aspiración folicular (WTA) Brasil, con una aguja metálica 20G y una tubuladura de silicona de 2 mm de diámetro interno descartable y tubos cónicos de 50 ml para la colecta. Se utilizó una presión de 90 mm Hg ó 20 ml de flujo/min, el medio de colecta utilizado fue una solución tampón de PBS y heparina.

Posteriormente el líquido folicular obtenido en la punción se lavó en un filtro vertical (MiniflushTM, Minitube) con una solución de PBS y suero bovino (2%). La búsqueda se realizó por medio de una lupa. Los ovocitos obtenidos se clasificaron sobre la base del cumulus y el aspecto del citoplasma.

Las colectas foliculares se transportaron al laboratorio y luego de su filtrado y la localización de los ovocitos, seleccionados y sometidos al proceso de lavado para ser llevados a maduración, fertilización y cultivo embrionario. Los embriones producidos se evaluaron de acuerdo a la clasificación de la IETS (Stringfellow y Seidel; 2000) y se transfirieron como embriones frescos; todos los embriones de calidad transferible y que se encontraban en el estadio adecuado (mórula compacta, blástula, blástula expandida, blástula eclosionada) a los 8 días desde la colección de los ovocitos. Las vacas receptoras del mismo establo se encontraban sincronizadas, de tal forma que se encontraban de 7 días pos presentación del celo. Las transferencias embrionarias se realizaron por el método no quirúrgico.

En una segunda fase se procedió a la aplicación del protocolo de superovulación, con la utilización de las siguientes hormonas:

Dispositivo de silicona inerte impregnado con 0,5 g de Progesterona natural de liberación controlada para un solo uso (DIB® 0.5) Zoetis, Dispositivo de silicona inerte impregnado con 1 g de progesterona natural de liberación controlada (DIB 1 g) Syntex, Análogo sintético del 17β estradiol Benzoato de Estradiol 1 mg/1 mL (GONADIOL) Zoetis, Análogo de prostaglandina Cloprostenol base 250 ug/ml (**CICLASE DL**) **ZOETIS**, Progesterona 25 mg/ml (GESTAVEC® 25) Vecol, GnRH Gonadorelina (diacetato tetrahidrato) 0,005 g, CEVA SANTE ANIMALE FRANCE, y finalmente gonadotrofinas hipofisarias de cerdo; cada frasco de 20 ml de Folltropin-V contiene FSH equivalente a 400 mg de NIH-FSH-P1. La solución final contiene 20 mg/ml. Folltropin-V diluido en un vial de 20 mL de inyección de cloruro de sodio bacteriostático USP.

El Protocolo de superovulación de donadoras para producción in vivo empleado fue el siguiente:

Tabla 3.4. Protocolo superovulación para vacas

Día	Hora	Tratamiento o Actividad
0	06:00	Aplicación de dispositivo intravaginal Aplicación de 2 ml beta estradiol + 50 mg P4
4	06:00	Aplicación de 2,5 ml de FSH
	18:00	Aplicación de 2,5 ml de FSH
5	06:00	Aplicación de 2 ml de FSH
	18:00	Aplicación de 2 ml de FSH
6	06:00	Aplicación de 1 ml de FSH
	18:00	Aplicación de 1 ml de FSH
7	06:00	Aplicación de 0,5 ml de FSH
	18:00	Aplicación de 0,5 ml de FSH - retiro de dispositivo intravaginal.
8	06:00	Aplicación de 2 ml de GnRH;
	18:00	Inseminación artificial.
9		Inseminación artificial.
15		Colecta de embriones.

Tabla 3.5. Protocolo de superovulación vaconas

Día	Hora	Tratamiento o Actividad
0	06:00	Aplicación de dispositivo intravaginal Aplicación de 2 ml beta estradiol + 50 mg P4.
4	06:00	Aplicación de 1,5 ml de FSH
	18:00	Aplicación de 1,5 ml de FSH.
5	06:00	Aplicación de 1 ml de FSH;
	18:00	Aplicación de 1 ml de FSH.
6	06:00	Aplicación de 1 ml de FSH + 2 ml PGF
	18:00	Aplicación de 1 ml de FSH + 2 ml PGF
7	06:00	Aplicación de 0,5 ml de FSH
	18:00	Aplicación de 0,5 ml de FSH- retiro de dispositivo intravaginal.
8	06:00	Aplicación de 2 ml de GnRH;
	18:00	Inseminación artificial.
9		Inseminación artificial.
15		Colecta de embriones.

El lavado uterino de las donantes se realizó 7 días después de la inseminación artificial. Todos los materiales utilizados fueron estériles, primero se colocó a la vaca donante en una manga, se rasuró y lavó la base de la cola y la vulva, se aplicó 2 ml de anestesia epidural (lidocaína al 2%) para inmovilizar la cola del animal y evitar las contracciones rectales.

Luego se realizó ultrasonografía con transductor lineal con 7,5 MHz y en modo B (MINDRAY DP50VET®. Shenzhen, Chinave) para determinar el número de cuerpos lúteos y de folículos anovulatorio antes de la cateterización de la donante.

Posteriormente se introdujo la mano por el recto para la manipulación del cérvix y de los cuernos uterinos, luego se procedió a introducir un mandril cubierto por una sonda Foley calibre 18 para llegar al cuerno uterino donde se infló el balón.

Una vez introducida la sonda Foley se extrajo el mandril y se conectó con un circuito Y para introducir y extraer el medio de lavado y arrastre PBS (aproximadamente 500 ml por cuerno uterino).

Después de recuperado el medio de lavado los embriones fueron aislados del volumen total mediante métodos de filtración (Filtro Em-Com) y drenaje, para poder realizar su evaluación morfológica y determinar su utilización posterior en un microscopio de contraste de fase. Se utilizó medio Holding de mantenimiento.

Los embriones producidos fueron evaluados de acuerdo a la clasificación de la IETS (Stringfellow y Seidel; 2000) y se transfirieron como embriones frescos todos los embriones de calidad transferible y que estén en el estadio adecuado (mórula compacta, blástula, blástula expandida, blástula eclosionada).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PRODUCCIÓN EMBRIONARIA *IN VIVO*

El análisis estadístico descriptivo (Cuadro 4.1) para cada una de las variables relacionadas con la producción de embriones *in vivo* muestra que para estructuras embrionarias la media y la mediana tienen valores de 7,64 y 6 respectivamente, lo cual puede indicar una distribución binomial de los valores de las observaciones, tal condición describe la presencia de una mayor variabilidad de los datos cuantificados. Para las medidas de dispersión, representadas por la desviación estándar y el coeficiente de variación, cuyo valor alcanza 96,73% muestra elevada dispersión de las observaciones de las estructuras embrionarias, siendo su intervalo de confianza $2,55 \leq 7,64 \leq 12,72$ a 5% de probabilidad.

Para el caso de los embriones transferibles, degenerados e infertilizados, las medidas de dispersión presentan alta variabilidad, con coeficientes de variación superiores a 100%, como es el caso de los embriones degenerados e infertilizados, mientras que para el caso de los embriones transferibles con coeficiente de variación de 77,66%. Los intervalos de confianza al 5% de probabilidad para la media corresponden a $1,62 \leq 4,09 \leq 6,56$; $0,00 \leq 2,73 \leq 6,76$; $0,00 \leq 0,82 \leq 1,89$; respectivamente. La media y la mediana de los valores para la variable embriones transferibles están más cercanas, en consecuencia, presentan menor coeficiente de variación (77,66%).

En relación a las variables embriones degenerados e infertilizados las cuales presentan mayor separación, en consecuencia, sus coeficientes de variación (235,46% y 155,51%, respectivamente) son más elevados. Tal condición describe menor variabilidad para la primera la variable; mientras que para los embriones degenerados e infertilizados la condición es opuesta y en ellos se observa la variabilidad más elevada.

Cuadro 4.1. Estadística descriptiva para las variables estructuras embrionarias, embriones transferibles, degenerados e infertilizados, cuerpos lúteos, folículos anovulatorios y total de estructuras ováricas en la condición in vivo.

Medidas centrales o de dispersión	Total Estructuras embrionarias	Embriones			Cuerpos lúteos	Folículos anovulatorios	Total estructuras ováricas	
		Transferibles	Degenerados	Infertilizados				
Media	7,64	4,09	2,73	0,82	9,18	7,00	16,18	
Mediana	6,00	4,00	0,00	0,00	10,00	4,00	18,00	
Varianza	57,25	13,49	36,02	2,56	24,16	39,60	34,96	
Desviación estándar	7,57	3,67	6,00	1,60	4,92	6,29	5,91	
Coeficiente variación	96,73	77,66	235,46	155,51	41,13	101,27	35,78	
Intervalo de confianza	Mínimo	2,55	1,62	0,00	0,00	5,88	2,77	12,21
	Máximo	12,72	6,56	6,76	1,89	12,48	11,23	20,15

En relación a las variables cuerpos lúteos y folículos anovulatorios las medidas de tendencia central describen disimilitud entre la media y la mediana para los cuerpos lúteos (9,18 y 10,00, respectivamente) mientras que esa separación es más acentuada para los cuerpos anovulatorios (7,0 y 4,0, respectivamente); en concordancia con esas distancias, para las medidas de dispersión, los folículos anovulatorios presentan coeficiente de variación de 101,27% en relación a 41,13% de los cuerpos lúteos, tal situación se compatibiliza en ambas medidas descriptivas, ratificando que donde existe mayor proximidad de las medidas de tendencia central les corresponde menor variabilidad en los datos, reflejados en las medidas de dispersión.

Las medidas de dispersión correspondientes a la varianza y la desviación estándar, se mantiene en concordancia con los coeficientes de variación, esto porque ambas forman parte de su estructura de cálculo. Los intervalos de confianza a 5% de probabilidad corresponden a $5,88 \leq 9,18 \leq 12,48$ y $2,77 \leq 7,00 \leq 11,23$ para los cuerpos lúteos y los folículos anovulatorios, respectivamente.

Para el total de estructuras embrionarias los valores promedios corresponden a 16,18 y una mediana de 18, valores relativamente próximos, lo que implica medidas de dispersión con valores más bajos, lo que particularmente se visualiza en el coeficiente de variación de 35,78%. Su intervalo de confianza a 5% de probabilidad corresponde a $12,21 \leq 16,18 \leq 20,15$.

En virtud de la alta variabilidad descrita anteriormente, las variables no cumplieron con los supuestos exigidos para el análisis de varianza paramétrico. En consecuencia, el análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis para las variables estructuras embrionarias, embriones transferibles, degenerados e infertilizados, cuerpos lúteos, folículos anovulatorios y total de estructuras ováricas en la condición in vivo están reflejados en el Cuadro 4.2. Se puede observar que solo se detectó diferencias significativas para los embriones transferibles para el factor niveles de HAM.

Cuadro 4.2. Resumen del análisis de varianza para las variables estructuras embrionarias, embriones transferibles, degenerados e infertilizados, cuerpos lúteos, folículos anovulatorios y total de estructuras ováricas en la condición in vivo.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios						
		Total Estructuras embrionarias	Embriones			Cuerpos lúteos	Folículos anovulatorios	Total estructuras ováricas
			Transferibles	Degenerados	Infertilizados			
Categoría	1	36,67 ^{ns}	11,09 ^{ns}	9,17 ^{ns}	3,30 ^{ns}	26,49 ^{ns}	0,37 ^{ns}	5,87 ^{ns}
Error	9	7,87	10,82	8,09	7,13	9,22	11,79	11,40
Nivel HAM	1	9,17 ^{ns}	52,80*	9,17 ^{ns}	20,63 ^{ns}	26,49 ^{ns}	0,37 ^{ns}	23,47 ^{ns}
Error	9	10,93	6,19	8,09	5,21	9,22	11,79	9,45
Categoría x Nivel HAM	3	19,39 ^{ns}	20,07 ^{ns}	6,06 ^{ns}	10,00 ^{ns}	20,56 ^{ns}	0,67 ^{ns}	9,13 ^{ns}
Error	7	7,05	6,90	9,12	5,36	6,83	14,93	11,59

ns = No significativo; * Significativo a 5% de probabilidad

La comparación de los valores promedios de la variable embriones transferibles indica que dentro de los niveles séricos de la hormona antimülleriana de 250 – 350 pg/ml se obtuvo el mayor número embriones con 6,67, lo cual fue estadísticamente superior al número de embriones obtenidos en los niveles de HAM de 150 – 250 pg/ml, donde sólo se produjeron 1,50 embriones (Cuadro 4.3).

Cuadro 4.3. Comparación de promedios del número de embriones transferibles en dos niveles séricos de HAM.

Nivel HAM (pg/ml)	Promedios	Ámbito Estadístico
250 – 350	6,67	A
150 – 250	1,50	B

El análisis de regresión indicó una relación causa – efecto entre los niveles de HAM y la producción de embriones in vivo. La Figura 4.1 muestra la respuesta directa de la producción de embriones ante los cambios en los niveles de la hormona, obteniéndose un ajuste lineal explicado a través de la ecuación $Y = 0,04X - 7,054$, con un coeficiente de determinación de 72%.

El objetivo de la superovulación es estimular un número de pequeños folículos antrales para que crezcan y maduren, dando como resultado múltiples ovulaciones. Por lo tanto, el conjunto de pequeños folículos antrales disponibles para la estimulación debe dictar la respuesta superovulatoria. El promedio de embriones transferibles obtenidos en los niveles más elevados de HAM evaluados concuerdan con los reportes de Hasler (2014), quien revisó los

desarrollos que han ocurrido en los últimos 40 años en la industria de transferencia de embriones de ganado, e informó que el número promedio de embriones transferibles se ha mantenido prácticamente sin cambios en aproximadamente 6 embriones transferibles por superovulación y recolección de embriones.

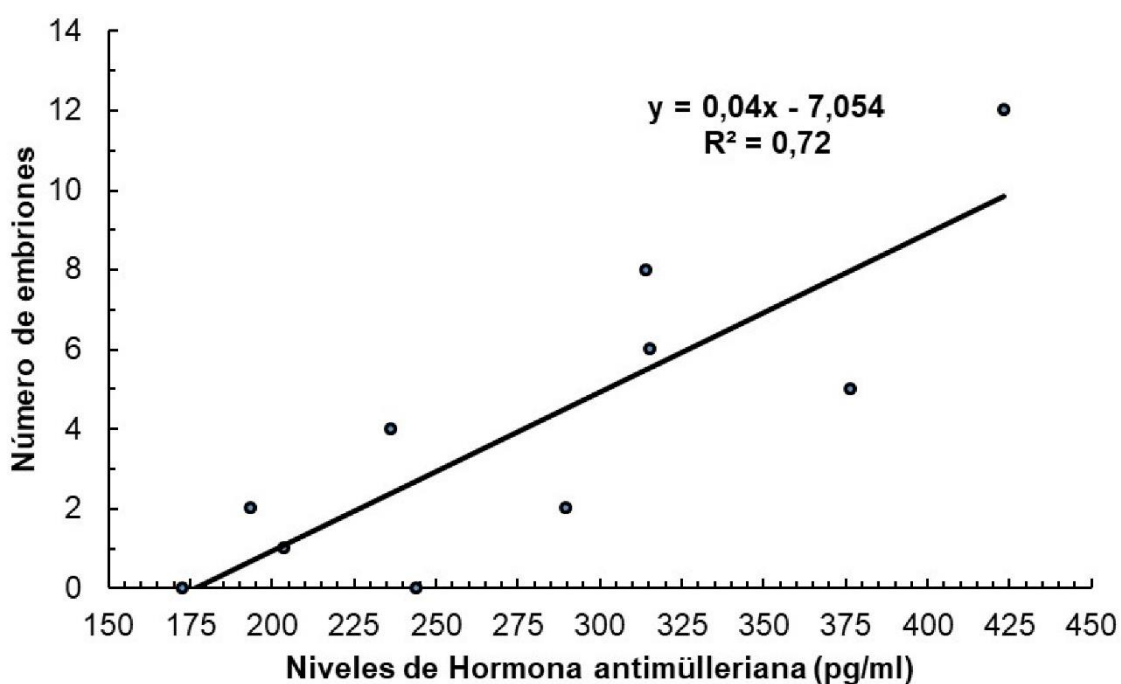


Figura 4.1. Variaciones de la producción de embriones in vivo ante los cambios en los niveles de la hormona antimülleriana en hembras Brahman.

Los niveles de HAM han sido correlacionados con el número de folículos antrales en hembras bovinas de diferentes categorías (Batista *et al.*, 2016) y grupos genéticos (Batista *et al.*, 2014). Similarmente, se han reportado variaciones entre razas de ganado (Batista *et al.*, 2014, Ribeiro *et al.*, 2014), lo cual implica umbrales distintos en los niveles de HAM para grupos genéticos diferentes cuando se trata de clasificar a los animales en clases de acuerdo a la población de folículos antrales (Guerreiro *et al.*, 2014; Baruselli *et al.*, 2015).

Estudios previos observaron una fuerte relación positiva entre los niveles circulantes de HAM y la producción de embriones in vivo después de la superovulación en ganado lechero (Monniaux *et al.*, 2010, Rico *et al.*, 2012, Souza *et al.*, 2015). Se ha encontrado correlación entre los niveles plasmáticos de HAM y una gran cantidad de folículos ováricos después de la superestimulación, número de CL después de la superovulación (Rico *et al.*, 2012, Rico *et al.*, 2009) y número de embriones producidos en vacas primípara y multíparas (Souza *et al.*, 2015).

Similarmente, Monniaux *et al.* (2010) informaron que las vacas lecheras superovuladas con niveles de HAM superiores a 200 pg/ml produjeron mayor cantidad de embriones transferibles. Resultados similares han sido reportados por Center *et al.* (2018) y Souza *et al.* (2015) quienes destacan la estrecha relación entre los niveles de HAM, la tasa de ovulación y el número de embriones recuperados.

Ireland *et al.* (2007) Señala que en hembras bovinas las concentraciones de HAM fueron aproximadamente 6 y 2 veces mayores en animales con un recuento de folículos antrales altos o intermedios, respectivamente, en comparación con los de baja concentración. En otro estudio realizado por Guerreiro *et al.* (2014), las donadoras clasificadas con niveles altos de HAM produjeron un número de embriones significativamente mayor (Holstein: 3.0; Nelore: 7.0) en comparación con aquellas de bajos niveles de HAM (Holstein: 1.2; Nelore: 2.2). Niveles de HAM superiores a los 400 pg/ml se asociaron a una mayor cantidad de folículos, de cuerpos lúteos y de embriones transferibles en vacas superovuladas; y resultó ser un predictor significativo de la respuesta a la superovulación (Peña y Correa, 2018).

Por otro lado, Center *et al.* (2018) no encontraron relaciones entre los niveles de HAM y la calidad morfológica del embrión, evaluada en términos de porcentaje de embriones transferibles, resaltando que novillas con altos números de

folículos produjeron mayor cantidad de embriones transferibles, pero esto no se reflejó en una proporción mayor, lo cual concuerda con los reportes de Ireland *et al* (2007) y de Souza *et al.* (2015) quienes afirman que no existe una correlación significativa entre la HAM en circulación y la tasa de fertilización.

Diversos estudios concuerdan en que los niveles circulantes de HAM y la población de folículos antrales se ha asociado directamente a variables cuantitativas relacionadas con la producción *in vitro* de embriones. Por lo tanto, Baruselli *et al.* (2016) destacan la importancia de evaluar los niveles plasmáticos de HAM para identificar a los animales con mayor probabilidad de tener mejores respuestas a la superestimulación y ser mejores donantes de ovocitos para la producción de embriones *in vitro*; mientras que Monteiro *et al.* (2017) resaltan la importancia de seleccionar donantes con una alta población de folículos para mejorar la eficiencia de los programas de producción de embriones *in vitro*.

4.2. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO*

El análisis estadístico descriptivo (Cuadro 4.4) muestra que para los ovocitos G1, G2 y G3 los valores de la media y la mediana es diferente, y por lo tanto, no siguen una distribución normal. Probablemente, los resultados presentan una distribución binomial, lo cual incide en las medidas de dispersión donde puede notarse coeficientes de variación muy elevadas para G1 (134,69%) y elevados tanto para G2 (71,12%) como para G3 (60,66%). Tales medidas de dispersión (varianza, desviación estándar y coeficiente de variación) reflejan lo indicado en variabilidad, visto que el cálculo del coeficiente de variación contiene tanto a la varianza como a la desviación estándar.

Los intervalos de confianza a 5% de probabilidad para los tres tipos de ovocitos corresponden a $0,11 \leq 0,70 \leq 1,29$; $0,92 \leq 1,80 \leq 2,68$; $2,44 \leq 4,50 \leq 6,56$, para G1, G2 y G3, respectivamente.

Cuadro 4.4. Estadística descriptiva para las variables ovocitos G1, ovocitos G2, ovocitos G3, ovocitos sin cumulus, ovocitos expandidos, ovocitos atrésicos, ovocitos degenerados y total ovocitos en la condición in vitro.

Medidas centrales o de dispersión	ovocitos			Sin cumulus	Ovocitos			Total ovocitos
	G1	G2	G3		Expandidos	Atrésicos	Degenerados	
Media	0,70	1,80	4,50	2,90	1,30	2,30	0,90	14,40
Mediana	0,50	1,50	4,00	2,00	1,00	1,50	1,00	14,00
Varianza	0,68	1,51	8,28	1,88	2,46	7,34	0,77	35,82
Desviación estándar	0,82	1,23	2,88	1,37	1,57	2,71	0,88	5,99
Coeficiente variación	134,69	71,12	60,06	56,02	87,89	130,23	88,81	42,84
Intervalo de confianza								
Mínimo	0,11	0,92	2,44	1,92	0,18	0,36	0,27	10,12
Máximo	1,29	2,68	6,56	3,88	2,42	4,24	1,53	18,68

La misma tendencia observada para los ovocitos se visualiza para la variable ovocitos sin cumulus, no presenta distribución normal, lo que se refleja tanto en las medidas de tendencia central (media y mediana) y en los valores de dispersión (varianza, desviación estándar y coeficiente de variación) donde particularmente para el coeficiente de variación (56,02%) presenta elevados valores y de modo similar le concierne a la varianza y desviación estándar. Su intervalo de confianza a 5% de probabilidad corresponde a $1,92 \leq 2,90 \leq 3,88$.

En concordancia con las variables anteriormente mencionadas, los ovocitos expandidos, atrésicos y degenerados presentan valores de media y mediana con distribución binomial. Este comportamiento se refleja en las medidas de dispersión analizadas, donde particularmente para el coeficiente de variación se observan valores muy elevados como es el caso de los ovocitos atrésicos (130,23%) y elevados tanto para los ovocitos expandidos y degenerados en el orden de 87,89% y 88,81%, respectivamente. La misma tendencia observada para el coeficiente de variación, está implícita en los valores de la varianza y de la desviación estándar. Los intervalos de confianza para los ovocitos expandidos, atrésicos y degenerados están en el orden de $0,18 \leq 1,30 \leq 2,42$; $0,36 \leq 2,30 \leq 4,24$ y $0,27 \leq 0,90 \leq 1,53$, respectivamente.

La variable total de ovocitos, mantiene el mismo patrón de comportamiento de las variables cuantificadas in vitro. Se ratifica la variabilidad entre las diferentes observaciones realizadas mostrando dispersión elevada de las observaciones con coeficiente de variación de 42,84%, valor promedio de 14,40 y mediana de 14,00 indicando distribución binomial de las observaciones; por otro lado, su intervalo de confianza a 5% de probabilidad es $10,12 \leq 14,40 \leq 18,68$.

Los valores de la estadística descriptiva para las variables ovocitos en el laboratorio, blastocitos expandido, blastocitos en eclosión y eclosionados; embriones transferibles, G1 y G2 en la condición in vitro están indicados en el Cuadro 4.5. Se constata para la variable ovocitos en el laboratorio una

distribución binomial de las observaciones, esto visualizado por la diferencia entre ambas las medidas de tendencia central referidas a la media y la mediana. Para las medidas de dispersión, el coeficiente de variación muestra un valor elevado (57,40%) lo que también es proporcional para la varianza y la desviación estándar que se incluyen en el cálculo del coeficiente de variación. El intervalo de confianza para esta variable es de $4,31 \leq 7,10 \leq 9,89$.

Caso idéntico al observado para la variable ovocitos en el laboratorio se constata para blastocitos expandido, se mantiene la variabilidad que caracteriza estas observaciones in vitro, detectándose coeficiente de variación del orden de 154,76%, lo que se traduce en alta incertidumbre estadística del material experimental evaluado, también observado para la varianza y la desviación estándar. La mediana como medida de posición al no ser idéntica a la media indica distribución del tipo binomial, donde ambas se relacionan, pero se mantiene la alta variabilidad estructural de la muestra considerada. El intervalo de confianza para esta variable corresponde a $0,02 \leq 3,00 \leq 5,89$.

Para los blastocitos en eclosión y eclosionados el comportamiento estadístico observado por medidas de tendencia central y/o dispersión no es distinto a lo verificado a las anteriores variables cuantificadas in vitro. Ellas, presentan los más elevados coeficientes de variación de las variables cuantificadas in vitro lo que indica su elevadísima variabilidad, que corresponden a 235,70% y 156,04% para blastocitos en eclosión y eclosionados, respectivamente.

De manera similar al coeficiente de variación, las medidas de dispersión como la varianza y desviación estándar siguen el mismo patrón y los datos no poseen distribución normal. La media de las observaciones es de 0,2 y 0,9 con medianas de 0 y 0,5 para ambas variables, respectivamente. Los intervalos de confianza a 5% de probabilidad para los blastocitos en eclosión y eclosionados corresponden a $0,00 \leq 0,20 \leq 0,50$ y $0,00 \leq 0,09 \leq 1,82$.

Cuadro 4.5. Estadística descriptiva para las variables ovocitos en el laboratorio, Blastocito expandido, blastocitos en eclosión y eclosionados; embriones transferibles, G1 y G2 en la condición in vitro.

Medidas centrales o de dispersión	Ovocitos en laboratorio	Blastocitos			Embriones			
		Expandido	En eclosión	Eclosionado	Total	G1	G2	
Media	7,1	3	0,2	0,9	4,1	3,7	0,4	
Mediana	6	1	0	0,5	3	2,5	0	
Varianza	15,21	17,33	0,18	1,66	18,32	21,12	0,27	
Desviación estándar	3,90	4,16	0,42	1,29	4,28	4,60	0,52	
Coeficiente variación	57,40	154,76	235,70	156,04	115,19	136,33	138,19	
Intervalo de Confianza	Mínimo	4,31	0,02	0,00	0,00	1,04	0,41	0,03
	Máximo	9,89	5,98	0,50	1,82	7,16	6,99	0,77

Para los embriones transferibles, G1 y G2, el comportamiento muestral no es distinto a lo cotejado para las demás variables in vitro. Los coeficientes de variación son elevadísimos prácticamente de similar magnitud a los observados para los blastocitos, ratificando así el comportamiento biológico para este tipo de análisis. Los coeficientes de variación son muy elevados 115,19%; 136,33% y 138,19%, para los embriones transferibles, G1 y G2, respectivamente. Obviamente las observaciones objeto de análisis no tienen distribución normal y la disimilitud entre la media y la mediana así lo ratifican, como una distribución binomial. Los respectivos intervalos de confianza para las tres variables corresponden a $1,04 \leq 4,10 \leq 7,16$; $0,41 \leq 3,70 \leq 6,99$ y $0,03 \leq 0,40 \leq 0,77$, respectivamente.

El análisis de varianza por la técnica no paramétrica de Kruskal-Wallis (Cuadros 4.6 y 4.7) solo mostró efectos significativos por la prueba de F a 5% de probabilidad para los ovocitos G3 dentro del factor niveles de HAM y para la variable blastocitos expandidos dentro del factor categorías de hembras Brahmán.

Cuadro 4.6. Resumen del análisis de varianza para las variables ovocitos G1, G2 y G3; ovocitos sin cumulus; ovocitos expandidos, ovocitos atrésicos y degenerados y total de ovocitos en la condición in vitro

Fuente de variación	GL	Cuadrados medios								
		Ovocitos				Ovocitos				Total ovocitos
		G1	G2	G3	Sin cumulus	Expandidos	Atrésicos	Degenerados		
Categoría	1	3,75 ^{ns}	6,67 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,10 ^{ns}	50,42 ^{**}	2,60 ^{ns}	1,67 ^{ns}	1,67 ^{ns}	
Error	8	8,28	8,73	9,95	8,05	3,07	9,61	8,98	9,85	
Nivel HAM	1	1,60 ^{ns}	2,50 ^{ns}	32,40 [*]	0,00 ^{ns}	0,40 ^{ns}	12,10 ^{ns}	25,60 ^{ns}	16,90 ^{ns}	
Error	8	8,55	9,25	5,95	8,06	9,33	8,43	5,99	7,95	
Categoría x Nivel HAM	3	2,14 ^{ns}	6,53 ^{ns}	10,94 ^{ns}	0,35 ^{ns}	17,14 ^{ns}	5,51 ^{ns}	10,69 ^{ns}	6,28 ^{ns}	
Error	6	10,60	9,49	7,86	10,58	3,93	10,49	6,90	10,28	

GL = Grados de libertad; *Significativo a 5% y 1% de probabilidad por la prueba de F; ns No significativo.

Cuadro 4.0.7. Resumen del análisis de varianza para las variables ovocitos en laboratorio, blastocitos expandido, blastocitos en eclosión y eclosionados; embriones transferibles, G1 y G2 en la condición in vitro.

Fuente de variación	GL	Cuadrados Medios						
		Ovocitos en Laboratorio		Blastocitos		Embriones		
		Expandido	En eclosión	Eclosionado	Total	G1	G2	
Categoría	1	0,42 ^{ns}	0,00 ^{ns}	6,67 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,10 ^{ns}	3,75 ^{ns}
Error	8	10,01	9,06	4,17	8,76	9,39	9,74	7,03
Nivel HAM	1	16,90 ^{ns}	4,90 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,10 ^{ns}	4,90 ^{ns}	10,00 ^{ns}	10,00 ^{ns}
Error	8	7,95	8,45	5,00	8,80	8,83	8,50	6,25
Categoría x Nivel HAM	3	5,78 ^{ns}	1,83 ^{ns}	2,22 ^{ns}	1,11 ^{ns}	1,86 ^{ns}	3,40 ^{ns}	4,72 ^{ns}
Error	6	10,53	11,17	5,56	11,19	11,65	11,30	7,64

GL = Grados de libertad; ^{ns}= No significativo.

La comparación de los valores promedios para el número de ovocitos G3 (Cuadro 4.8), indica que los mayores valores de ovocitos G3 están asociados al nivel de HAM de 150 – 250 pg/ml con 5,0 ovocitos, siendo estadísticamente superiores a los obtenidos en los niveles hormonales de 250 – 350 pg/ml, donde se determinaron 2,83 ovocitos G3. Similarmente, la Figura 4.2 muestra la relación causa – efecto entre los niveles de HAM y el número de ovocitos G3, representando una relación inversa explicada a través de la ecuación $Y = -0,026X + 11,026$, con un ajuste de 50,3%.

Cuadro 4.8. Comparación de promedios del número de ovocitos G3 en dos niveles séricos de la hormona antimülleriana

Nivel HAM	Promedios	Ámbito Estadístico
150 – 250	5,00	A
250 – 350	2,83	B

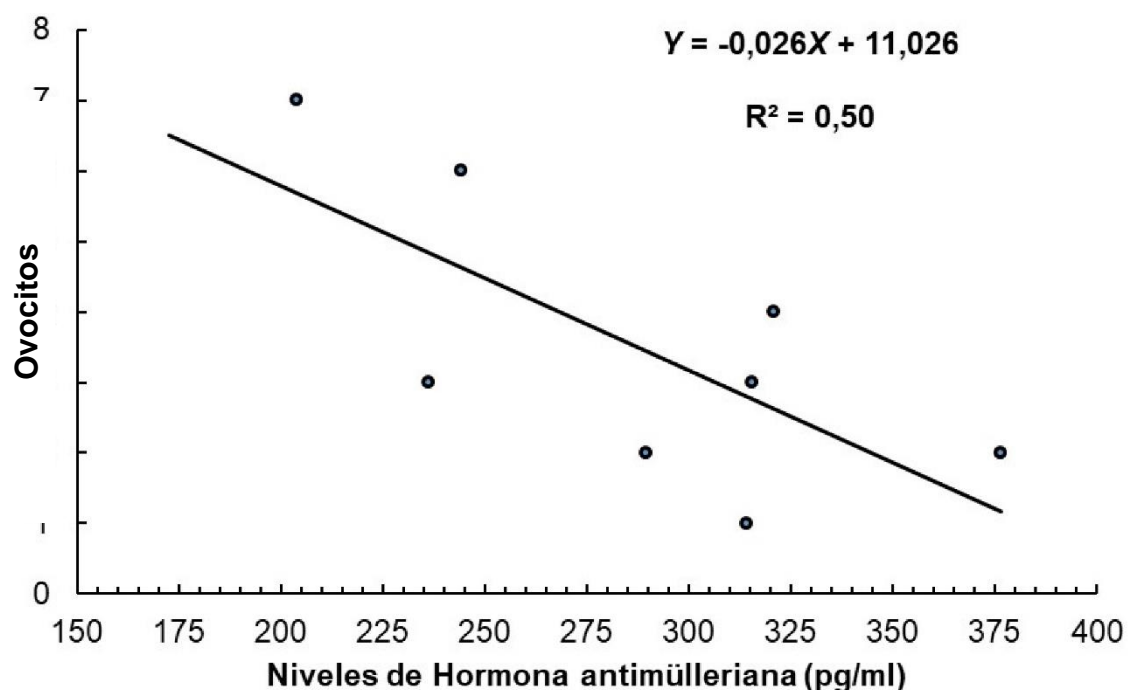


Figura 4.2. Variaciones de producción de ovocitos G3 ante los cambios en los niveles de la hormona antimülleriana en hembras Brahman

Por otro lado, para la variable ovocitos expandidos la comparación de los valores promedios dentro de las categorías de las hembras bovinas (Cuadro 4.9) demuestra que los valores obtenidos para las vacas (2,75) resultaron estadísticamente superiores a los valores para las vaconas donde se obtuvo un promedio de 0,42 blastocitos.

Cuadro 4.9. Comparación de promedios del número de ovocitos expandidos en dos categorías de hembras Brahmán.

Nivel HAM	Promedios	Ámbito Estadístico
Vacas	2,75	A
Vaconas	0,42	B

La recolección de ovocitos mediante la captación de óvulos asociada con la producción in vitro de embriones es una tecnología importante que puede mejorar la eficiencia de los rebaños de ganado lechero y bovino (Pontes *et al.*, 2010). La producción de embriones in vitro recientemente se ha orientado a la búsqueda de marcadores para la producción de embriones, dentro de los cuales se incluye el análisis de HAM (Baruselli *et al.*, 2016).

La tendencia reciente en los métodos de biotecnología reproductiva se ha dirigido a la utilización de novillas muy jóvenes. En tal sentido, Bayeux *et al.* (2016) reportaron la colección de ovocitos en terneros Holstein, destacando la dificultad para realizar exámenes de ultrasonido, por lo cual Center *et al.* (2018) recomiendan la realización de un análisis de HAM en plasma para seleccionar novillas con mayor número de folículos antrales, que probablemente responderían mejor a la producción y recolección de ovocitos.

El número de blastocitos producidos por recolección de ovocitos y producción de embriones *in vitro* depende del número de ovocitos recuperados y la selección óptima de vacas donantes para un programa de producción de embriones *in vitro* parece ser el mejor enfoque para la obtención competitiva de un alto número de embriones (Ghanem, *et al.*, 2016).

Center *et al* (2018) encontraron una alta correlación entre la concentración de HAM y la población folicular en vacas, pero esta condición no se mantuvo para las vacas. Los niveles de HAM también se correlacionaron positivamente con el número de ovulaciones y embriones transferibles producidos, lo cual ratificó los resultados de Monniaux *et al.* (2010) y de Rico *et al.* (2009). Por su parte, Pinto *et al.* (2018) indicaron que los niveles de HAM en plasma representó un método de alta precisión para identificar ovejas con mayor potencial para la ovulación múltiple y la transferencia embrionaria, siendo altamente reproducible y confiable para seleccionar mejores donantes con una sola evaluación.

Hirayama *et al.* (2017) informaron que la evaluación de la concentración de HAM durante las primeras etapas de hembras bovinas es valiosa para la selección de potenciales donantes embrionarios en el ganado negro japonés. En tal sentido, Fushimi *et al.* (2019) reportaron que las novillas de 7-10 meses de edad con mayor concentración de HAM tenían mayor número de folículos en sus ovarios y dieron mayor número de ovocitos durante la recolección de ovocitos en comparación a las novillas de 13-15 meses de edad, concluyendo que una única medición de la concentración plasmática de HAM entre los 7 y los 10 meses de edad podría ser un método eficaz para seleccionar las novillas donadoras para la recolección de ovocitos o la superovulación.

Rico *et al.* (2012) y Fushimi *et al.* (2019) reportaron que las mediciones de la concentración plasmática de HAM antes de cada repetición del protocolo recolección de ovocitos eran altamente repetibles durante un período de un año y guarda estrecha relación con los recuentos de folículos antrales. Sin embargo,

varios estudios han indicado que la concentración de HAM es altamente variable entre los individuos, y que los factores que afectan las reservas ováricas (que afectan indirectamente a la concentración de HAM circulante) pueden ser la nutrición materna, las enfermedades y la presencia de alteradores endocrinos durante el embarazo (Ireland *et al.*, 2011; Mossa *et al.*, 2017; Monniaux, 2018).

En general, un mayor número de folículos antrales da como resultado una mejor eficiencia cuantitativa de recolección de ovocitos y producción de embriones *in vitro*. Diversas investigaciones indican que la población de folículos antrales se asocia positivamente con el número de embriones producidos por hembras donantes de diferentes razas (Ireland *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014, Santos *et al.*, 2016). Aunque, más recientemente, Monteiro *et al.* (2017) no encontraron ninguna ventaja para las hembras *Bos indicus* con alta población folicular en relación con las tasas de producción de embriones.

Existe una fuerte correlación positiva entre la concentración de HAM y la respuesta superovulatoria medida por la ovulación y la tasa de recuperación de embriones en el ganado (Monniaux *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2014; Hirayama *et al.*, 2017), cabras (Monniaux *et al.*, 2011), ovejas (Lahoz *et al.*, 2014; García *et al.*, 2017) y búfalos (Redhead *et al.*, 2018). Esta relación ha permitido que la concentración de HMA se utilice como marcador endocrino predictivo de ovulación y tasas de recuperación de embriones después de la superovulación (Guerreiro *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2014; Batista *et al.*, 2016).

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Durante la producción de embriones *in vitro*, no se encontraron efectos de los niveles de HAM ni de las categorías de las hembras Brahmán sobre la producción de ovocitos; sin embargo, fue la variable que presentó la menor variabilidad durante el ensayo y presentó un promedio de 14,40.

La producción *in vivo* de embriones se vio favorecida dentro de los niveles séricos de la hormona antimülleriana de 250 – 350 pg/ml, con un promedio de 6,67, estadísticamente superior al número de embriones obtenidos en los niveles de HAM de 150 – 250 pg/ml. En el caso de la producción *in vitro*, se obtuvo un promedio de 4,1 embriones y no se observaron efectos derivados del nivel de HAM ni de la categoría del animal.

Durante el proceso *in vitro*, se obtuvo mayor número de ovocitos G3 dentro de los niveles de HAM de 150 – 250 pg/ml. Por su parte, las vacas Brahmán produjeron mayor número de ovocitos expandidos que las vaconas.

5.2. RECOMENDACIONES

La producción de embriones *in vivo* en los niveles más elevados de HAM estuvo ligeramente por encima del promedio general indicado por la literatura, sin embargo, los resultados obtenidos durante la producción *in vitro* contradicen la tendencia de obtención de mejores resultados con animales jóvenes y con altos niveles de HAM reportada en la literatura. En tal sentido, se recomienda continuar la línea de investigación para dilucidar a ciencia cierta el efecto de los niveles de HAM sobre la producción de embriones *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. 2012. Técnicas de laboratorio usadas con frecuencia en inmunología. Inmunología celular y molecular. 7 ma Edición. pp 513- 514.
- Adams, H. 2001. Prostaglandins, related factors, and cytokines. Section 4. Chap 21st pp 420-432 En: Adams H. R. Veterinary pharmacology and therapeutics. 8th Edition. Iowa State University Press/AMES.
- Asprón. 2004. Curso de Actualización - Manejo Reproductivo del Ganado Bovino, Extraído el 22 de Jun. 2018 Disponible en http://www.ivis.org/continuing_education/short_courses/reproduction_bovine/aspron_es/ivis.pdf.
- Bage, R.; Petyim, S.; Larsson, B.; Hallap, T.; Bergqvist, A.; Gustafsson, H.; Rodríguez, H. 003. Oocyte competence in repeat-breeder heifers: effects on optimized ovum pick-up schedule on expression of oestrus, follicular development and fertility. *Reproduction Fertility and Development* (15):115-123,
- Baruselli OS, Batista EOS, Vieira LM, Souza AH. 2015. Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. *Anim Reprod*, 12:487-497.
- Baruselli, P. S., Batista, E. O. S., Vieira, L. M., Ferreira, R. M., Guerreiro, B. G., Bayeux, B. M., & Gimenes, L. U. 2016. Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. *Anim. Reprod*, 13(3), 264-272.
- Batista, E. O. S., G. G. Macedo, R. V. Sala, M. Ortolan, M. F. Sa Filho, T. A. Del Valle, E. F. Jesus, R. Lopes, F. P. Renno, and P. S. Baruselli. 2014. Plasma anti-Mullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. *Reprod. Domest. Anim.* 49:448–452.
- Batista, E. O. S., Guerreiro, B. M., Freitas, B. G., Silva, J. C. B., Vieira, L. M., Ferreira, R. M., Rezende, R.G., Basso, A.C., Lopes, R.N., Rennó, F.P.,

- Souza, A.H., Baruselli, P.S. 2016. Plasma anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker to select *Bos taurus* (Holstein) and *Bos indicus* (Nelore) calves for in vitro embryo production. *Domestic animal endocrinology*, 54, 1-9.
- Bayeux BM, Carvalho LM, Watanabe YF, Mingoti RD, Oliveira AdS, Chiba MO, Azrak AJ, Castro PMdN, Souza AH, Baruselli PS. 2016. Efeito da categoria (pré-púberes, púberes e prenhes) na produção in vitro de embriões de novilhas da raça holandesa [in portuguese]. In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 25 a 27 de agosto, 2016, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu: Paraná, Brasil, p.256. Abstract.
- Bo, G. y Caccia, M. 2000. Ultrasonografía reproductiva en el ganado bovino. (En línea). Consultado, 19 de ene. 2018. Formato PDF. Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/ecografia_ultrasonido/39-ultrasonografia_reproductiva_en_bovino.pdf
- Borges, A.M., C.A.A. Torres, J.R.M. Ruas, V.R. Jr Rocha, G.R. Carvalho. 2001. Dinámica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 53:595-604.
- Callejas, S. 2001. Fisiología del ciclo estral bovino, pp 37 – 60. Palma, G.A. (eds) *Biotechnología de la Reproducción*.
- Carvalho J.B.P., Carvalho N.A.T., Reis E.L., Nichi M., Souza A.H., Baruselli P.S. 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, 69:167–75.
- Center, K., Dixon, D., Looney, C., y Rorie, R. 2018. Anti-mullerian hormone and follicle counts as predictors of superovulatory response and embryo production in beef cattle. *Advances in Reproductive Sciences*, 6(01), 22.
- Church, D. 1993. *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition* Corvallis, Zaragoza (España). pp. 525-537.

- Crowe A.M., D. Goulding, A. Baguisl, P.M. Boland, J.F. Roche. 1993. Induced ovulation of the first postpartum dominant follicle in beef suckler cows using a GnRH analogue. *J. Reprod. Fertil.* 99, 551-555.
- Cutini, A., Teruel, M., Cabodevila, J. 2000. Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. *Revista Taurus.* 7:28-39.
- Denis, R.G., Loayza, P., Fuentes, D., Bernal, A., Nuñez, Ismary. 2000. Dinámica folicular de los genotipos Criollo y Siboney de Cuba. En: Primer Congreso Internacional de Mejora Animal. La Habana Cuba. p 56 – 62
- Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M. Balzarini, L. González, M. Tablada y C. Robledo. 2017. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Donaldson, L. E. 1984. Effect of age of donor cows on embryo production. *Theriogenology*, 21 (6): 963-967.
- Duica, A., Tovio, N., Grajales H. 2007. Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de transplante de embriones bovinos. *Revista de Medicina Veterinaria, Universidad de La Salle, Bogota, Colombia.* 14:107-124
- Echeverrías, J. 2006. Endocrinología Reproductiva: Prostaglandina F2a en vacas. Argentina, PLA. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET.* Vol. VII, No. 01. p 7.
- Espinoza, J; Ortega, R; Palacios, A; Valencia, J; Aréchiga, C. 2007. Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interciencia*, 32(2), 93-99.
- Fortune, J.E., 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. of Reprod.* 50:225-232.
- Fushimi, Y., Monniaux, D., & Takagi, M. 2019. Efficacy of a single measurement of plasma anti-Müllerian hormone concentration for ovum pick-up donor selection of Japanese Black heifers in herd breeding programs. *Journal of Reproduction and Development.*

- Garcia-Salas, A., Cortez-Romero, C., Salazar-Ortiz, J., Arroyo-Ledezma, J., Vaquera-Huerta, V.M., Gallegos-Sanchez, J., 2017. Administration of exogenous hormones in ovulatory and embryonic response in pelibuey sheep. *Reprod. Domest.* 8, 1–6.
- Ghanem N, Jin JI, Kim SS, Choi BH, Lee KL, Ha AN, Song SH, Kong IK. 2016. The anti-Müllerian hormone profile is linked with the in vitro embryo production capacity and embryo viability after transfer but cannot predict pregnancy outcome. *Reprod Dom Anim*; 51: 301-310.
- González, P. 2013. Utilidad de la hormona antimulleriana (HAM) según especialistas latinoamericanos en reproducción asistida. Tesis de Maestría. Buenos Aires: Universidad de Favaloro.
- Grujters, M.J., J.A. Visser, A.L. Durlinger, A.P. Themmen. 2003. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol.* 211: 85-90.
- Guerreiro, B.M., E.O.S. Batista, L.M. Vieira, M.F. Sá Filho, C.A. Rodrigues, A. Castro Netto, C.R.A. Silveira, B.M. Bayeux, E.A.R. Dias, F.M. Monteiro, M. Accorsi, R.N.V.R. Lopes, P.S. Baruselli. 2014. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domest. Anim. Endocrin.* 49:96–104.
- Hasler, J.F. 2014. Forty Years of Embryo Transfer in Cattle: A Review Focusing on the Journal *Theriogenology*, the Growth of the Industry in North America, a Personal Reminiscence. *Theriogenology* , 81, 152-169.
- Hasler, W.W. Thatcher. 1999. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology.* 52:1161-1167.
- Hirayama H, Naito A, Fukuda S, Fujii T, Asada M, Inaba Y, Takedomi T, Kawamata M, Moriyasu S, Kageyama S. 2017. Long-term changes in plasma anti-Müllerian hormone concentration and the relationship with superovulatory response in Japanese Black cattle. *J Reprod Dev*; 63: 95-100.

- Holm, P., Greve, T. y Willeberg, P. 1987. Description and analysis of factors influencing the response of 449 superovulated donor cows and heifers. *Theriogenology* 27: 238.
- Hunter, R. H. F. 2003. Advances in deep uterine insemination: a fruitful way forward to exploit new sperm technologies in cattle. *Animal Reproduction Science*, 79 (3-4), 157-170.
- INIAP-Pichilingüe. 2019. Estación Experimental Tropical Pichilingüe, Quevedo - El Empalme, cantón Mocache, Provincia Los Ríos.
- Ireland J.L.H., Scheetz D., Jimenez-Krassel F., Themmen A.P.N., Ward F., Lonergan P., Smith G.W., Perez G.I., Evans A.C.O. y Ireland, J.J. 2008. Antral Follicle Count Reliably Predicts Numbers of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle. *Biology of Reproduction*. 79:1219-1225.
- Ireland, J. J., Smith, G. W., Scheetz, D., Jimenez, F., Folger, J. K., Ireland, J. L. H., y Evans, A. C. O. 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 cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(1), 1-14.
- Ireland, J.J., F. Ward, F. Jimenez, J.L. Ireland, G.W. Smith, P. Lonergan, A.C. Evans. 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.
- Jimenez, F., D. Scheetz, L. Neuder, J. Ireland, J. Pursley, G. Smith, R. Tempelman, T. Ferris, W. Roudebush, and F. Mossa. 2015. Concentration of anti-Müllerian hormone in dairy heifers is positively associated with productive herd life. *J. Dairy Sci*. 98(5):3036-3045.
- Kanitz, W., F. Becker, F. Schneider, E. Kanitz, C. Leiding, H. P. Nohner, and R. Pöhland. 2002. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod. Nutr. Dev*. 42: 587-599.

- Kawamata, M. 1994. Relationships between the number of small follicles prior to superovulatory treatment and superovulatory response in Holstein cows. *J Vet. Med. Sci.* 56:965–967.
- Lahoz, B., Alabart, J.L., Monniaux, D., Echegoyen, E., Sanchez, P., Folch, J., 2014. Anti-Mullerian hormone concentration in sheep and its dependence of age and independence of BMP-15 genotype: an endocrine predictor to select the best donors for embryo biotechnologies. *Theriogenology* 81, 347–357.
- Larocca, C., I. Lago, A. Fernández, G. Rosés, R. Lanza, P.A. Ugón, D. Boggio. 2005. Alternativas para la sincronización del estro en vaquillonas Holstein. Disponible. *Rev. Científ. FCV-LUZ.* 15: 512-516.
- Lucy, M.C., J.D. Savio, L. Badinga, R.L. de la Sota, W.W. Thatcher. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci* 70:3615-3626.
- Malhi, P. S., G. P. Adams, and J. Singh. 2005. Bovine model for the study of reproductive aging in women: Follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biology of Reproduction.* 73: 45-53.
- Mapletoft R.J., Bó G.A., Adams G.P. 2000. Los avances en la manipulación del ciclo estral en la vaca donante y la receptora en los programas de transferencia de embriones *Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre,* 28:23-48.
- Martínez, N. 2005. Fisiología Reproductiva de la Hembra. Colombia, BOG. *Revista de Medicina Veterinaria.* No 14. p 107-124.
- Monniaux D. Factors influencing establishment of the ovarian reserve and their effects on fertility. In: *Proceeding of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS 2018); 2018; Brazil.* *Anim Reprod* 15 (Suppl. 1); 635-647
- Monniaux, D., Barbey, S., Rico, C., Fabre, S., Gallard, Y., Larroque, H. 2010. Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? *Reproduction, Fertility and Development,* 22 (7), 1083-1091.
- Monniaux, D., Di Clemente, N., Touzé JI., Belville, C., Rico, C., Bontoux, M., Picard, J.Y. Y Fabre, S. 2008. Intrafollicular steroids and anti - Müllerian

- hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol. Reprod.* 79, 387-396
- Monteiro FM, Batista EOS, Vieira LM, Bayeux BM, Accorsi M, Campanholi SP, Dias EAR, Souza AH, Baruselli PS. 2017. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. *Theriogenology*, 90:54-58.
- Mossa F, Jimenez F, Scheets D, Weber-Nielsen M, Evans ACO, Ireland JJ. 2017. Anti-Müllerian hormone (AMH) and fertility management in agricultural species. *Reproduction*; 154: R1-R11.
- Mossa, F. 2014. La hormona antimulleriana como indicadora de la capacidad reproductiva en la vaca. (En línea). Consultado, 14 Jun. 2018. Disponible en: <https://www.reproducation.com/es/Trials-y-Articulos/2014.01.02-La-hormona-antimulleriana-como-indicadora-de-la-capacidad-reproductiva-en-la-vaca>
- Murphy B.D., Martinuk D. 1991. Gonadotropina Corianica Equina. *Endocrine Reviews*, 12:27-44.
- Navil, M. 2007. Inducción de la Ovulación Para Fertilización in vitro. *Revista Oficial de la Sociedad de Fertilidad OBGYN*. Egipto. Volumen 29. Suplemento N° 1. 30-36.
- Ochoa J.C., Ramírez R.R.A., Piccardi M.B., Bó G.A., Tríbulo R. J. 2009. Influencia de la estacion en la producción de embriones en donantes de embriones de raza para carne. VIII Simposio Internacional de Reproducción Bovina, Córdoba, Argentina, 26, 27 y 28 de septiembre. CD.
- Orellana, J. y Peralta E. 2007. Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and Sexing Technologies, Zamorano, Honduras.
- Paigrave, K. 2012. Reproducción bovina Libro de ultrasonido con Easi-Scan. (En línea). Consultado, 19 de ene. 2018. Formato PDF. Disponible en <https://www.bcftechnology.es/media/3627/bcf-bovine-booklet-spanish-low-res.pdf>

- Peña C., M. C., y Correa C., D. A. 2018. Respuesta superovulatoria asociada a los niveles de hormona antimulleriana en vacas donadoras. Trabajo de grado. Maestría en Ciencias en Sistemas de Producción Animal. Universidad Autónoma de Baja California. 65 p.
- Peters, R.; Martinez, T; Cook, J. 2004. A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11-14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 54, 1317-1326.
- Pfeiffer, K; Jurado, L; Larson, J. 2014. Determination of anti-Müllerian hormone at estrus during a synchronized and a natural bovine estrous cycle. *Domestic Animal Endocrinology*. 46:58-64.
- Pinto, P. H. N., Balaro, M. F. A., Souza-Fabjan, J. M. G., dos Santos Ribeiro, L., Bragança, G. M., Leite, C. R., ... & Brandão, F. Z. 2018. Anti-Müllerian hormone and antral follicle count are more effective for selecting ewes with good potential for in vivo embryo production than the presence of FecGE mutation or eCG pre-selection tests. *Theriogenology*, 113, 146-152.
- Pontes JH, Silva KC, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GM, Sanches BV, Porcionato JP, Vieira PH, Faifer FS, Sterza FA, Schenk JL, Seneda MM. 2010. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, 74:1349-1355.
- Prieto, B.; Velázquez, M.; 2002. Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotropinas. UNAM. Vol. 45. No. 6.
- Rangel-Portal, L., A. Lassala-Irueste, C. Gutiérrez-Aguilar. 2010. Fisiología veterinaria e introducción a la fisiología de los procesos productivos. D.R. Universidad Autónoma de México. (1ra. ed.) México D.F. Pp.469-479.
- Redhead, A. K., Siew, N., Lambie, N., Carnarvon, D., Ramgattie, R., & Knights, M. 2018. The relationship between circulating concentration of AMH and LH content in the follicle stimulating hormone (FSH) preparations on follicular growth and ovulatory response to superovulation in water buffaloes. *Animal reproduction science*, 188, 66-73.

- Reeves, J. 2010. Endocrinología de la reproducción. En: Hafez, E.S.E. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. McGraw-Hill, S.A. de C.V. México D.C. Pág. 91-115.
- Rey, R; Bedecarrás, P; Brugo, O; Vincentiis, S; Calamera, P; Blanco, A; Grinspon, R; Freire, A; Buffone, M. 2013. Hormona antimulleriana (HAM) como herramienta diagnóstica en la mujer. *Revista Saegre*. :12-24.
- Ribeiro, E; Bisinotto, R; Lima, F; Greco, L; Morrison, A; Kumar, A; Thatcher, W; Santos, J. 2014. Plasma anti-Mullerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *American Dairy Science Association*. 97:6888-6900.
- Ribeiro, E; Bisinotto, R; Lima, F; Greco, L; Morrison, A; Kumar, A; Thatcher, W; Santos, J. 2014. Plasma anti-Mullerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *American Dairy Science Association*. 97:6888-6900
- Ricárdez, M. 2015. Efectos de la hormona antimulleriana (HAM) en bovinos. (En línea). Consultado, 15 de jun. 2018. Formato PDF. Disponible en <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7793/MATHUS%20RICARDEZ%20MARTINEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rico, C., Drouilhet, L., Salvetti, P., Dalbies-Tran, R., Jarrier, P., Touze, J.L., Pillet, E., Ponsart, C., Fabre, S. and Monniaux, D. 2012. Determination of Anti-Mullerian Hormone Concentrations in Blood as a Tool to Select Holstein Donor Cows for Embryo Production: From the Laboratory to the Farm. *Reproduction, Fertility and Development*, 24, 932-944.
- Rico, C., S. Fabre, C. Médigue, N. di Clemente, F. Clément, M. Bontoux, J.L. Touzé, M. Dupont, E. Briant, B. Rémy, J.F. Beckers, D. Monniaux. 2009. Anti-müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive.
- Rosales Torres, A.M, Guzmán Sánchez, A. 2012. Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its receptors during the ovarian cycle. Review. *Rev. Mex. de Ciencias Pecuarias*, 89- 111.

- Santos GM, Silva-Santos KC, Barreiros TRR, Morotti F, Sanches BV, de Moraes FLZ, Blaschi W, Seneda MM. 2016. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. *Anim Reprod Sci*, 165:17-21.
- Sartori S., Sartor-Bergfelt R., Mertens S.A., Guenther J.N., Parrish J.J., Wiltbank M.C. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in Winter. *J Dairy Sci*, 85:2803-2812.
- Silva-Santos KC, Seneda MM, de Andrade Melo-Sterza F. 2015. Antral follicles population in heifers and cows of Nelore and Girolando breeds. *Semina: Ciênc Agrár*, 36:3741-3750.
- Sintex. 2005. Fisiología reproductiva del bovino. En: Laboratorio de Especialidades Veterinarias. (En línea). Consultado, 19 de ene. 2018. Disponible en www.produccion-animal.com.ar.
- Souza A.H., Carvalho P.D., Rosner A.E., Vieira L.M., Hackbart K.S., Bender R.W., Dresch A.R., Verstegen J.P., Shaver R.D. y Wiltbank M.C. 2015. Relationship between circulating anti-Mullerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 98:169-178.
- Stringfellow, D; Seidel G. 2000. Manual of the International Embryo Transfer Society, 3rd Ed. IETS. Illinois, EUA. Pp. 181.
- Tonhati, H., R.B. Lobo, H.N. Oliveira. 1999. Repeatability and heritability of response to superovulation in Holstein cows. *Theriogenology*. 51:1151–1156.
- Vizuite A. 2012. Manejo y alimentacion de las vacas donadoras de embriones de la raza Holstein Friesian. Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela de Ingenieria zootecnica.
- Webb, R., R.G. Gosden, E.E. Telfer, R.M. Moor. 1999. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *J. Anim. Sci.* 68: 257-284.

ANEXOS

Anexo 1. Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilks modificado) para variables evaluadas *in vivo*.

Variable	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Estructuras embrionarias	5,9	5,17	0,88	0,2066
Embriones fertilizados	4	3,86	0,9	0,3004
Embriones degenerados	1	1,89	0,6	<0,0001
Embriones infertilizados	0,9	1,66	0,58	<0,0001
Cuerpos luteos	9,3	5,17	0,88	0,2001
Foliculos anovulatorios	7,4	6,48	0,72	0,001
Total estructuras ováricas	16,7	5,96	0,87	0,1633

Anexo 2. Prueba de F para homogeneidad de varianzas para variables evaluadas *in vivo*.

Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	Var(1)	Var(2)	F	p
Estructuras embrionarias	{150 - 250}	{250 - 350}	9,2	32,8	3,56	<0,0001
Embriones fertilizados	{150 - 250}	{250 - 350}	2,8	13,8	4,92	<0,0001
Embriones degenerados	{150 - 250}	{250 - 350}	0	5,5	100	<0,0001
Embriones infertilizados	{150 - 250}	{250 - 350}	4,2	0	100	<0,0001
Cuerpos luteos	{150 - 250}	{250 - 350}	29,5	17,3	1,71	0,6178
Foliculos anovulatorios	{150 - 250}	{250 - 350}	46,5	47,7	1,11	0,9809
Total estructuras ováricas	{150 - 250}	{250 - 350}	47	14,8	3,18	0,0288

Anexo 3. Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilks modificado) para variables evaluadas *in vitro*.

Variable	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Blastocito G1	0,67	0,87	0,72	0,0016
Blastocito G2	1,89	1,27	0,94	0,6691
Blastocito G3	3,5	2,07	0,9	0,4164
Sin cumulus	3	1,41	0,76	0,006
Blastoc Expandido	1,44	1,59	0,78	0,0141
Blastoc Atresicos	1,67	1,94	0,83	0,0688
Blastoc degenerados	0,78	0,83	0,77	0,011
Total ovocitos	12,56	5,34	0,93	0,6442
Ovocitos Laborat	6,33	3,24	0,93	0,6334
BX Expandido	1,78	1,64	0,79	0,0191
Blastoc En_Eclosion	0,22	0,44	0,53	<0,0001
Blastoc Eclosionado	1	1,32	0,78	0,0119
Total Embriones	3	2,65	0,77	0,0088
Embriones G1	2,56	3	0,81	0,039
Embriones G2	0,44	0,53	0,61	<0,0001

Anexo 4. Prueba de F para homogeneidad de varianzas para variables evaluadas *in vitro*.

Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	Var(1)	Var(2)	F	p
Blastocito G1	{150 - 250}	{250 - 350}	1	0,7	1,43	0,217
Blastocito G2	{150 - 250}	{250 - 350}	1,58	1,8	1,14	0,354
Blastocito G3	{150 - 250}	{250 - 350}	4,33	1,3	3,33	0,028
Sin cumulus	{150 - 250}	{250 - 350}	1,33	3	2,26	0,045
Blastoc Expandido	{150 - 250}	{250 - 350}	2,92	2,7	1,08	0,305
Blastoc Atresicos	{150 - 250}	{250 - 350}	1,58	6,3	3,99	0,029
Blastoc degenerados	{150 - 250}	{250 - 350}	0,92	0,3	3,06	0,031
Total ovocitos	{150 - 250}	{250 - 350}	35	24	1,46	0,404
Ovocitos Laborat	{150 - 250}	{250 - 350}	12,92	7,7	1,68	0,316
BX Expandido	{150 - 250}	{250 - 350}	4	2,3	1,74	0,394
Blastoc En_Ecllosion	{150 - 250}	{250 - 350}	0,25	0,2	1,25	0,406
Blastoc Ecllosionado	{150 - 250}	{250 - 350}	3,67	0,3	12,22	0,015
Total Embriones	{150 - 250}	{250 - 350}	14,25	2,3	6,20	0,030
Embriones G1	{150 - 250}	{250 - 350}	16,33	4,2	3,89	0,043
Embriones G2	{150 - 250}	{250 - 350}	0,25	0,3	1,20	0,517

Anexo 2. Análisis estadísticos de las distintas variables estudiadas.

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Estr_Embr by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	4	5
Vacona	7,7	6
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	36,667	36,6667	4,66	0,0592
Within	9	70,833	7,8704		
Total	10	107,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Embriones by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	4,9	5
Vacona	6,9	6
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	11,092	11,0917	1,02	0,3378
Within	9	97,408	10,8231		
Total	10	108,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Emb_Degen by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	5	5
Vacona	6,8	6
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	9,1667	9,16667	1,13	0,3149
Within	9	72,8333	8,09259		
Total	10	82			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Emb_Infer by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	5,4	5
Vacona	6,5	6
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	3,3	3,3	0,46	0,5135
Within	9	64,2	7,13333		
Total	10	67,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Cueposlut by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	4,3	5
Vacona	7,4	6
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	26,492	26,4917	2,87	0,1244
Within	9	83,008	9,2231		
Total	10	109,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for FoI_anovu by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	6,2	5
Vacona	5,8	6
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	0,367	0,3667	0,03	0,8639
Within	9	106,133	11,7926		
Total	10	106,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Tot_Est_O by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	5,2	5
Vacona	6,7	6
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	5,867	5,8667	0,51	0,4914
Within	9	102,633	11,4037		
Total	10	108,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Estr_Embr by Nivel HAM

Nivel HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	5,2	6
270 - 350	7	5
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	9,167	9,1667	0,84	0,3836
Within	9	98,333	10,9259		
Total	10	107,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Embriones by Nivel HAM

Nivel HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	4	6
270 - 350	8,4	5
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	52,8	52,8	8,53	0,017
Within	9	55,7	6,1889		
Total	10	108,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Emb_Degen by Nivel HAM

Nivel HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	5,2	6
270 - 350	7	5
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	9,1667	9,1667	1,13	0,3149
Within	9	72,8333	8,09259		
Total	10	82			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Emb_Infer by Nivel HAM

Nivel HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	7,3	6
270 - 350	4,5	5
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	20,625	20,625	3,96	0,0778
Within	9	46,875	5,2083		
Total	10	67,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Cueposlut by Nivel HAM

Nivel HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	4,6	6
270 - 350	7,7	5
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	26,492	26,4917	2,87	0,1244
Within	9	83,008	9,2231		
Total	10	109,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Fol_anovu by Nivel HAM

Nivel HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	5,8	6
270 - 350	6,2	5
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	0,367	0,3667	0,03	0,8639
Within	9	106,133	11,7926		
Total	10	106,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Tot_Est_O by Nivel HAM

Nivel HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	4,7	6
270 - 350	7,6	5
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	23,467	23,4667	2,48	0,1495
Within	9	85,033	9,4481		
Total	10	108,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Estr_Embr by CategoríaxHAM

CategoríaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	2,3	3
Vaca270	6,5	2
Vacona200	8	3
Vacona270	7,3	3
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	58,167	19,3889	2,75	0,122
Within	7	49,333	7,0476		
Total	10	107,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Embriones by CategoríaxHAM

CategoríaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	3	3
Vaca270	7,8	2
Vacona200	5	3
Vacona270	8,8	3
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	60,208	20,0694	2,91	0,1105
Within	7	48,292	6,8988		
Total	10	108,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Emb_Degen by CategoríaxHAM

CategoríaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	4	3
Vaca270	6,5	2
Vacona200	6,3	3
Vacona270	7,3	3
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	18,1667	6,05556	0,66	0,6001
Within	7	63,8333	9,11905		
Total	10	82			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Emb_Infer by CategoríaxHAM

CategoríaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	6	3
Vaca270	4,5	2
Vacona200	8,5	3
Vacona270	4,5	3
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	30	10	1,87	0,2234
Within	7	37,5	5,3571		
Total	10	67,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Cuerpo_lut by CategoríaxHAM

CategoríaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	2,2	3
Vaca270	7,5	2
Vacona200	7	3
Vacona270	7,8	3
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	61,667	20,5556	3,01	0,1041
Within	7	47,833	6,8333		
Total	10	109,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Fol_anovul by CategoríaxHAM

CategoríaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	6,3	3
Vaca270	6	2
Vacona200	5,3	3
Vacona270	6,3	3
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	2	0,6667	0,04	0,9864
Within	7	104,5	14,9286		
Total	10	106,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Tot_Est_O by CategoríaxHAM

CategoríaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	4,2	3
Vaca270	6,8	2
Vacona200	5,2	3
Vacona270	8,2	3
Total	6	11

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	27,375	9,125	0,79	0,5381
Within	7	81,125	11,5893		
Total	10	108,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Oocytes_G1 by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	6,3	4
Vacona	5	6

Total	5,5	10
-------	-----	----

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	3,75	3,75	0,45	0,52
Within	8	66,25	8,28125		
Total	9	70			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Oocytes_G2 by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	6,5	4
Vacona	4,8	6
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	6,6667	6,66667	0,76	0,4076
Within	8	69,8333	8,72917		
Total	9	76,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for oocytes_G3 by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	5,8	4
Vacona	5,3	6

Total	5,5	10
-------	-----	----

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	0,4167	0,41667	0,04	0,843
Within	8	79,5833	9,94792		
Total	9	80			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Oocytes Sin_cumul by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	5,6	4
Vacona	5,4	6
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	0,1042	0,10417	0,01	0,9122
Within	8	64,3958	8,04948		
Total	9	64,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Blast_Exp by Categoría

--	--	--

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	8,3	4
Vacona	3,7	6
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	50,4167	50,4167	16,41	0,0037
Within	8	24,5833	3,0729		
Total	9	75			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Blast_Atr by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	4,9	4
Vacona	5,9	6
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	2,6042	2,60417	0,27	0,6168
Within	8	76,8958	9,61198		
Total	9	79,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Blast_deg by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	5	4
Vacona	5,8	6
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	1,6667	1,66667	0,19	0,678
Within	8	71,8333	8,97917		
Total	9	73,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Total ovoc by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	6	4
Vacona	5,2	6
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	1,6667	1,66667	0,17	0,6917
Within	8	78,8333	9,85417		
Total	9	80,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for OvocitLab by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	5,8	4
Vacona	5,3	6
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	0,4167	0,4167	0,04	0,8434
Within	8	80,0833	10,0104		
Total	9	80,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for BX_Expand by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	5,5	4
Vacona	5,5	6
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	0	0	0	1
Within	8	72,5	9,0625		
Total	9	72,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for BlastEnEc by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	4,5	4
Vacona	6,2	6
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	6,6667	6,66667	1,6	0,2415
Within	8	33,3333	4,16667		
Total	9	40			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Blast_Ecl by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	5,8	4
Vacona	5,3	6
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	0,4167	0,41667	0,05	0,8328
Within	8	70,0833	8,76042		
Total	9	70,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Trans_Embri by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	5,3	4
Vacona	5,7	6
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	0,4167	0,41667	0,04	0,8384
Within	8	75,0833	9,38542		
Total	9	75,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Embr_ by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	5,6	4
Vacona	5,4	6
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	0,1042	0,10417	0,01	0,9202
Within	8	77,8958	9,73698		
Total	9	78			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Embr_G2 by Categoría

Categoría	Mean Rank	Sample Size
Vaca	4,8	4
Vacona	6	6
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	3,75	3,75	0,53	0,486
Within	8	56,25	7,03125		
Total	9	60			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Oocytes_G1 by Rang_HAM

Rang_HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	5,1	5
270 - 350	5,9	5
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	1,6	1,6	0,19	0,6767

Within	8	68,4	8,55		
Total	9	70			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Oocytes_G2 by Rang_HAM

Rang_HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	6	5
270 - 350	5	5
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	2,5	2,5	0,27	0,6172
Within	8	74	9,25		
Total	9	76,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Oocytes_G3 by Rang_HAM

Rang_HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	7,3	5
270 - 350	3,7	5
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	32,4	32,4	5,45	0,0479

Within	8	47,6	5,95		
Total	9	80			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Sin_cumul by Rang_HAM

Rang_HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	5,5	5
270 - 350	5,5	5
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	0	0	0	1
Within	8	64,5	8,0625		
Total	9	64,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Blast_Exp by Rang_HAM

Rang_HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	5,7	5
270 - 350	5,3	5
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	0,4	0,4	0,04	0,8411

Within	8	74,6	9,325		
Total	9	75			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Blast_Atr by Rang_HAM

Rang_HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	6,6	5
270 - 350	4,4	5
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	12,1	12,1	1,44	0,265
Within	8	67,4	8,425		
Total	9	79,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Blast_deg by Rang_HAM

Rang_HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	7,1	5
270 - 350	3,9	5

Total	5,5	10
-------	-----	----

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	25,6	25,6	4,28	0,0725
Within	8	47,9	5,9875		
Total	9	73,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Totalovoc by Rang_HAM

Rang_HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	6,8	5
270 - 350	4,2	5
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	16,9	16,9	2,13	0,1829
Within	8	63,6	7,95		
Total	9	80,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for OvocitLab by Rang_HAM

Rang_HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	6,8	5
270 - 350	4,2	5
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	16,9	16,9	2,13	0,1829
Within	8	63,6	7,95		
Total	9	80,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for BX_Expand by Rang_HAM

Rang_HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	6,2	5
270 - 350	4,8	5
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	4,9	4,9	0,58	0,4682
Within	8	67,6	8,45		
Total	9	72,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for BlastEnEc by Rang_HAM

Rang_HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	5,5	5
270 - 350	5,5	5
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	0	0	0	1
Within	8	40	5		
Total	9	40			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Blast_Ecl by Rang_HAM

Rang_HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	5,6	5
270 - 350	5,4	5
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	0,1	0,1	0,01	0,9177
Within	8	70,4	8,8		
Total	9	70,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Trans_Embri by Rang_HAM

Rang_HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	6,2	5
270 - 350	4,8	5
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	4,9	4,9	0,56	0,4775
Within	8	70,6	8,825		
Total	9	75,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Embr_G1 by Rang_HAM

Rang_HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	6,5	5
270 - 350	4,5	5
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	10	10	1,18	0,3097
Within	8	68	8,5		
Total	9	78			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Embr_G2 by Rang_HAM

Rang_HAM	Mean Rank	Sample Size
200 - 270	4,5	5
270 - 350	6,5	5
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	10	10	1,6	0,2415
Within	8	50	6,25		
Total	9	60			

**Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Oocytes_G1
by CategoriaxHAM**

CategoriaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	6,3	2
Vaca270	6,3	2
Vacona200	4,3	3
Vacona270	5,7	3
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	6,4167	2,1389	0,2	0,8915
Within	6	63,5833	10,5972		
Total	9	70			

**Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Oocytes _G2 by
CategoriaxHAM**

CategoriaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	8,3	2

Vaca270	4,8	2
Vacona200	4,5	3
Vacona270	5,2	3
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	19,5833	6,52778	0,69	0,5915
Within	6	56,9167	9,48611		
Total	9	76,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Oocytes _G3 by CategoriaxHAM

CategoriaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	7,5	2
Vaca270	4	2
Vacona200	7,2	3
Vacona270	3,5	3
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	32,8333	10,9444	1,39	0,3332
Within	6	47,1667	7,8611		
Total	9	80			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Sin_cumul by CategoriaxHAM

CategoriaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	6	2
Vaca270	5,3	2
Vacona200	5,2	3
Vacona270	5,7	3
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	1,0417	0,3472	0,03	0,9912
Within	6	63,4583	10,5764		
Total	9	64,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Blast_Exp by CategoriaxHAM

CategoriaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	8,8	2
Vaca270	7,8	2
Vacona200	3,7	3
Vacona270	3,7	3
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	51,4167	17,1389	4,36	0,0594
Within	6	23,5833	3,9306		
Total	9	75			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Blast_Atr by CategoriaxHAM

CategoriaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	6,5	2
Vaca270	3,3	2
Vacona200	6,7	3
Vacona270	5,2	3
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	16,5417	5,5139	0,53	0,6807
Within	6	62,9583	10,4931		
Total	9	79,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Blast_deg by CategoriaxHAM

CategoriaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	5,8	2

Vaca270	4,3	2
Vacona200	8	3
Vacona270	3,7	3
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	32,0833	10,6944	1,55	0,2961
Within	6	41,4167	6,9028		
Total	9	73,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Totalovoc by Rang_HAM

CategoriaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	7,5	2
Vaca270	4,5	2
Vacona200	6,3	3
Vacona270	4	3
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	18,8333	6,2778	0,61	0,6323
Within	6	61,6667	10,2778		
Total	9	80,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for OvocitLab by CategoriaxHAM

CategoriaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	7	2
Vaca270	4,5	2
Vacona200	6,7	3
Vacona270	4	3
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	17,3333	5,7778	0,55	0,6671
Within	6	63,1667	10,5278		
Total	9	80,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for BX_Expand by CategoriaxHAM

CategoriaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	6,5	2

Vaca270	4,5	2
Vacona200	6	3
Vacona270	5	3
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	5,5	1,8333	0,16	0,9167
Within	6	67	11,1667		
Total	9	72,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for BlastEnEc by CategoriaxHAM

CategoriaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	4,5	2
Vaca270	4,5	2
Vacona200	6,2	3
Vacona270	6,2	3
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	6,6667	2,22222	0,4	0,7583
Within	6	33,3333	5,55556		
Total	9	40			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Blast_Ecl by CategoriaxHAM

CategoriaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	6,5	2
Vaca270	5	2
Vacona200	5	3
Vacona270	5,7	3
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	3,3333	1,1111	0,1	0,9575
Within	6	67,1667	11,1944		
Total	9	70,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Trans_Embri by CategoriaxHAM

CategoriaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	5,8	2
Vaca270	4,8	2
Vacona200	6,5	3
Vacona270	4,8	3
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	5,5833	1,8611	0,16	0,9196
Within	6	69,9167	11,6528		
Total	9	75,5			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Embr_G1 by CategoriaxHAM

CategoriaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	6,8	2
Vaca270	4,5	2
Vacona200	6,3	3
Vacona270	4,5	3
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	10,2083	3,4028	0,3	0,8239
Within	6	67,7917	11,2986		
Total	9	78			

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for Embr_G2 by CategoriaxHAM

CategoriaxHAM	Mean Rank	Sample Size
Vaca200	3,5	2
Vaca270	6	2
Vacona200	5,2	3
Vacona270	6,8	3
Total	5,5	10

Parametric AOV Applied to Ranks					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	14,1667	4,72222	0,62	0,6283
Within	6	45,8333	7,63889		
Total	9	60			