



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS  
NATURALES**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Título:

---

**PREÑEZ DE VACAS MESTIZAS CON LA IMPLANTACIÓN DE EMBRIONES  
IN VIVO E IN VITRO, PARA MEJORAR LA GENÉTICA BOVINA EN MACAS**

---

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de Médico  
Veterinario Zootecnista

**Autora:**

Pilla Caizabanda Nina Mónica

**Tutor:**

Garzón Jarrin Rafael Alonso Ph.D.

**LATACUNGA – ECUADOR**

**Agosto 2021**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

**Nina Mónica Pilla Caizabanda**, con cedula de ciudadanía no. **1804849667**, declaro ser autora del presente proyecto de investigación: **“Preñez de vacas mestizas con la implantación de embriones in vivo e in vitro, para mejorar la genética bovina en Macas”**, siendo el **Mvz, Ph.D, Rafael Alonso Garzón Jarrin**, Tutor del presente trabajo; y, eximo expresamente a la **Universidad Técnica de Cotopaxi** y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 13 de agosto 2021

Nina Mónica Pilla Caizabanda  
Estudiante  
C.C.-180484966-7

Ph.D. Rafael Alonso Garzón Jarrin  
Docente Tutor  
C.C 0501097224

## CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **PILLA CAIZABANDA NINA MÓNICA** identificado con cedula de ciudadanía **180484966-7**, de estado civil Divorciada y con domicilio en la Ciudad de Ambato Provincia de Tungurahua, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, el Ing. MBA. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez Barrio El Ejido Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes

### ANTECEDENTES:

**CLÁUSULA PRIMERA.** - **LA CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado **Proyecto de investigación** la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad según las características que a continuación se detallan:

#### **Historial académico:**

Fecha de inicio de la carrera: abril 2016 – agosto 2016

Fecha de Finalización: Abril 2021 – Agosto 2021

Aprobación en Consejo Directivo: 26 de Enero del 2021

Tutor: PhD. Garzón Jarrin Rafael Alfonso

Tema: “Preñez de vacas mestizas con la implantación de embriones frescos in vivo e in vitro, para mejorar la genética bovina en de Macas”.

**CLÁUSULA SEGUNDA.** - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

**CLÁUSULA TERCERA.** - Por el presente contrato, **LA CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

**CLÁUSULA CUARTA.** - **OBJETO DEL CONTRATO:** Por el presente contrato **LA CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.

b) La publicación del trabajo de grado.

c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.

d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.

f) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

**CLÁUSULA QUINTA.** - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

**CLÁUSULA SEXTA.** - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

**CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD.** - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA CEDENTE** podrá utilizarla.

**CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA CEDENTE** en forma escrita.

**CLÁUSULA NOVENA.** - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en las cláusulas cuartas, constituirá causal de resolución del presente contrato. En VII consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

**CLÁUSULA DÉCIMA.** - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

**CLÁUSULA UNDÉCIMA.** - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga a los 23 días del mes de agosto de 2021.

Nina Mónica Pilla Caizabanda  
**LA CEDENTE**

Ing. Ph.D. Cristian Tinajero Jiménez  
**LA CESIONARIA**

## **AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

En calidad de Tutor del Proyecto de Investigación con el título:

**“PREÑEZ DE VACAS MESTIZAS CON LA IMPLANTACIÓN DE EMBRIONES IN VIVO E IN VITRO, PARA MEJORAR LA GENÉTICA BOVINA EN MACAS.”**. de **PILLA CAIZABANDA NINA MÓNICA** de la carrera **MEDICINA VETERINARIA**, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 3 de agosto del 2021

Ph.D. Rafael Alfonso Garzón Jarrin

CI: 0501097224

Docente Tutor

## **AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, la postulante: Pilla Caizabanda Nina Mónica, con el título de Proyecto de Investigación: **“PREÑEZ DE VACAS MESTIZAS CON LA IMPLANTACIÓN DE EMBRIONES IN VIVO E IN VITRO, PARA MEJORAR LA GENÉTICA BOVINA EN MACAS”**, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Latacunga, 20 de agosto del 2021

Lector 1 (Presidente)

PhD. Edilberto Chacón Marcheco  
CC: 1756985691

Lector 2

Dr. Mg. Luis Alonso Chicaiza Sánchez  
CC: 0501308310

Lector 3

Dra. Mg. Blanca Mercedes Toro Molina  
CC: 0501720999

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por bendecir mis pasos a cada instante para alcanzar mis metas profesionales.

Un agradecimiento profundo y de todo corazón a mi tía María Caizabanda por su paciencia y apoyo incondicional, a mi padre Sergio Pilla, eres mi mayor inspiración para haber culminado esta etapa de mi vida, gracias por todo es amor que me han brindar durante todo el proceso.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi, facultad de Medicina Veterinaria y a sus docentes quien me han impartido conocimiento y experiencias para formar un profesional a carta cabal y en servicio de la sociedad. Y de manera muy especial a mi maestro y mentor el PhD Rafael Alfonso Garzón Jarrin por su apoyo incondicional y a su gran colaboración para el desarrollo del proyecto investigativo.

A la Finca los Leones, Dr. Jorge Luis León, por haberme abierto las puertas, mi gratitud y agradecimiento por su valiosa ayuda, su tiempo y dedicación que contribuyeron en la elaboración de este proyecto investigativo.

A mis familiares y amigos que me supieron acompañar durante este largo camino de estudio esfuerzo y trabajo, gracias por su paciencia absoluta.

Nina Mónica Pilla Caizabanda

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo está dedicado con mucho cariño a Dios, a mis padres Sergio Pilla, Francisca Caizabanda y María Caizabanda quienes han sido el pilar fundamental de sabiduría y experiencia velando siempre por mi bienestar y depositando su confianza en mí, a quienes les debo todo lo que soy, que con su exponencial ayuda y motivación he logrado salir adelante.

A mis hermanos Sergio, Ignacio y Sandy, por ayudarme y brindarme su apoyo incondicional en todo el trayecto de mis estudios, a pesar de peleas y risas me ha llenado de ánimos, y me ha enseñado que siempre hay que ser perseverante en la vida, para conseguir nuestros sueños.

Y a toda mi familia y amigos que con sus palabras de aliento me ayudaron a terminar este gran paso muy importante en mi vida.

Nina Mónica Pilla Caizabanda



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**TITULO: PREÑEZ DE VACAS MESTIZAS CON LA IMPLANTACIÓN DE EMBRIONES IN VIVO E IN VITRO, PARA MEJORAR LA GENÉTICA BOVINA EN MACAS**

**Autora:** Nina Mónica Pilla Caizabanda

**RESUMEN**

La presente investigación se realizó con el objetivo de evaluar la efectividad de la multiovulación y la transferencia de embriones (MOET) y la producción de embriones in vitro (PIVE) sobre la producción de embriones y tasa de preñez. El estudio se realizó en la finca los Leones del Cantón Macas, Provincia de Morona Santiago, Ecuador. Se utilizaron tres donadoras Charoles para cada una de las técnicas y 40 vacas receptoras (30 para embriones en vivo y 10 para embriones in vitro). Para MOET se aplicó un tratamiento superovulatorio combinado con uno de sincronización de la ovulación. Se detectó el celo y las vacas fueron inseminadas con dos dosis de semen. En el día 7 luego del celo se practicó lavado uterino y los embriones grado 1 fueron transferidos a vacas receptoras. Las vacas donadoras de ovocitos se colectaron bajo anestesia epidural mediante el método de aspiración folicular guiada por ultrasonido. Los embriones producidos fueron transferidos en fresco en el día 7 luego de la fecundación in vitro. Los datos se analizaron mediante estadísticos descriptivos del programa SAS. Las vacas donadoras por MOET produjeron 30 embriones transferibles grado 1, que produjeron 16 preñeces (tasa de preñez de  $53,1 \pm 7,2\%$ ). De las tres vacas donadoras usadas para PIVE se colectaron 25 ovocitos, de los cuales 10 alcanzaron el estadio de blastocisto y fueron transferidos, resultando solo una vaca preñada (tasa de preñez de  $20 \pm 17,3\%$ ). El análisis económico demostró que el costo por embrión fue con la MOET fue 2.5 veces menor que con la PIVE (195,7 y 500,0 US\$ respectivamente). Se concluye que la MOET fue la biotécnica reproductiva más efectiva, tanto biológica como económicamente, para la producción de embriones con fines mejoramiento genético.

**Palabras clave:** embriones in vivo, embriones in vitro, transferencia, tasa preñez, bovino, trópico

# **TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI**

## **FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES**

**Theme:** “Pregnancy of Crossbred Cows with In Vivo and In Vitro Embryo Implantation to Improve Bovine Genetics in Macas.”

**Author:** Nina Mónica Pilla Caizabanda

### **ABSTRACT**

This research aimed to evaluate the effectiveness of multi-ovulation and embryo transfer (MOET) and in vitro embryo production (PIVE) on embryo production and pregnancy rate. The study was conducted at Leone's farm in Macas Canton, Morona Santiago Province, Ecuador. Three Charol donors were used for each technique and 40 recipient cows (30 for live embryos and 10 for in vitro embryos). For MOET, a superovulation treatment combined with an ovulation synchronization treatment was applied. Oestrus was detected, and cows were inseminated with two doses of semen. On day seven after oestrus, uterine lavage was performed, and grade 1 embryos were transferred to recipient cows. Oocyte donor cows were collected under epidural anesthesia using the ultrasound-guided follicular aspiration method. Embryos produced were transferred fresh on day seven after in vitro fertilization. Data were analyzed by descriptive statistics using SAS software. MOET donor cows produced 30 grade 1 transferable embryos, which produced 16 pregnancies (pregnancy rate of  $53.1 \pm 7.2\%$ ). From the three donor cows used for PIVE, 25 oocytes were collected, of which 10 reached the blastocyst stage and were transferred, resulting in only one pregnant cow (pregnancy rate of  $20 \pm 17.3\%$ ). The economic analysis showed that the cost per embryo with MOET was 2.5 times lower than with PIVE (195.7 and 500.0 US\$ respectively). It is concluded that MOET was the most effective reproductive bio-technique, both biologically and economically, for the production of embryos for breeding purposes.

**Keywords:** In Vivo Embryos, In Vitro Embryos, Transfer, Pregnancy Rate, Cattle, Tropics.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR	iii
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	v
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
INDICES DE ANEXOS	xiii
1 INFORMACIÓN GENERAL	1
2 JUSTIFICACIÓN	2
3 BENEFICIARIOS DEL PROYECTO	3
3.1 Directos	3
3.2 Indirectos	3
4 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3
5 OBJETIVOS	5
5.1 General	5
5.2 Específicos	5
6 FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA	6
6.1 Generalidades	6
6.2 Fisiología reproductiva	6
6.2.1 Ciclo estral	6
6.3 Dinámica folicular	10
6.3.1 Reclutamiento	11
6.3.2 Selección	11
6.3.3 Dominancia folicular	12
6.4 Biotecnologías reproductivas en los bovinos	12
6.5 Multiovulación y transferencia de embriones	15
6.6 Producción <i>in vitro</i> de embriones	17
6.7 Selección de hembras donantes y receptoras	20
6.7.1 Donantes	20
6.7.2 Receptoras	21

6.8	Factores que afectan la preñez en programas de transferencia de embriones	22
6.9	Calidad del embrión	26
7	METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	27
7.1	Área de investigación	27
7.2	Materiales utilizados en la investigación	27
	Materiales para observar y seleccionar embriones	27
7.3	Vacas donadoras	28
	7.3.1 Selección de vacas donadoras	28
8	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
9	CONCLUSIONES	39
10	RECOMENDACIONES	39
11	BIBLIOGRAFÍA	40
12.	ANEXOS	1

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Materiales utilizados durante la investigación	29
Ttabla 2.	Protocolo de superovulación y sincronización de la ovulación en donadoras	27
Tabla 3.	Protocolo de sincronización de la ovulación en vacas receptoras	33
Tabla 4.	Número de embriones in vivo obtenidos por vaca donadora	35
Tabla 5.	Número de ovocitos colectados y de embriones obtenidos in vitro por vaca	37
Tabla 6.	Precios de productos usados en el tratamiento de superovulación	38
Tabla 7.	Costo por embrión producido in vitro y costo por preñez	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El eje reproductivo	7
Figura 2. Modelo de crecimiento folicular en la vaca	11
Figura 3. Desarrollo generacional de las biotecnologías reproductivas	14
Figura 4. Esquema del protocolo de superovulación P-36	17
Figura 5. Blastocistos en diferentes estadios de desarrollo	20
Figura 6. Protocolo de sincronización de la ovulación en vacas receptoras	23
Figura 7. Mórula compacta	24
Figura 8. Blastocisto temprano	24
Figura 9. Blastocistos regulares	25
Figura 10. Blastocistos regulares expandidos	25
Figura 11. Blastocisto exclosionado	26
Figura 13. Área geográfica donde se ubica la finca los Leones	28
Figura 14. Tasa de preñez en vacas receptoras de embriones in vivo	36
Figura 15. Tasa de preñez en vacas receptoras de embriones in vitro	37

## INDICES DE ANEXOS

Anexo 1: Aval de traducción	1
Anexo 2: Hoja de vida de tutor	2
Anexo 3: Hoja de vida de la autora	3
Anexo 4: Lavado de embriones	4
Figura 1: Vaca donadora ungi.	4
Figura 2: Vaca donadora bucana.	4
Figura 3: Vaca donadora cachitos.	4
Figura 4: Lavado de embriones	4
Figura 5: Selección de embriones	5
Figura 6: Los embriones in vivo	5
Figura 7: Transferencia de embriones	5
Figura 8: Chequeo ginecológico a las receptoras	5

## **1 INFORMACIÓN GENERAL**

### **Título del Proyecto:**

Preñez de vacas mestizas con la implantación de embriones frescos in vivo e in vitro, para mejorar la genética bovina en de Macas.

**Fecha de inicio:** octubre 2020

**Fecha de finalización:** Marzo 2021

### **Lugar de ejecución:**

En la ciudad de Macas \_ Morona Santiago

### **Facultad que auspicia:**

Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales- CAREN

### **Carrera que auspicia:**

Medicina Veterinaria

### **Proyecto de investigación vinculado:**

Producción Animal y Nutrición

### **Equipo de Trabajo:**

PhD Dr. Rafael Garzón Jarrin (anexo 2)

Nina Monica Pilla Caizabanda (anexo 3)

### **Área de Conocimiento:**

Agricultura, Silvicultura y Pesca

### **Línea de investigación:**

Desarrollo y seguridad alimentaria

### **Sub líneas de investigación de la Carrera:**

Fisiología animal y reproducción

## 2 JUSTIFICACIÓN

La producción ganadera y agrícola son pilares fundamentales de la actividades económica y social del Cantón Macas, Provincia Morona Santiago. En el área ganadera este cantón tiene excelentes tierras para la crianza y explotación de ganado de carne como es el caso de la raza Charoles, que tanto auge ha tenido debido a su excelente adaptación a las particulares condiciones geográfica, ambientales y climáticas que predominan en esta región del país. Desde este cantón se abastece de ganado Charoles a las provincias de Azuay, Pastaza, Guayas Tungurahua, Quito, y otras localidades de la provincia Morona Santiago (1).

Una de las principales limitantes de la producción bovina en los trópicos es el deficiente desempeño reproductivo y productivo debido a múltiples factores ambientales y genéticos que limitan estas importantes y complejas funciones biológicas. Entre ellos se destaca la raza, la época del año, el estado nutricional, el número de partos, y otros (2).

Por otro lado, en condiciones normales, una vaca puede tener solo una cría al año, si logra preñarse antes de los 90 días luego del parto. De esta manera se pierde la oportunidad de que una hembra de alto valor genético multiplique su descendencia. Sin embargo, desde mediados de los años de 1970 la superovulación y la transferencia de embriones ha permitido incrementar el número de crías que pueden obtenerse de una vaca genéticamente superior (2). Asimismo, la producción *in vitro* de embriones, una biotecnología reproductiva desarrollada algunos años después, ha posibilitado incrementar aún más el número de descendientes por vaca/año, y con ello, aumentar el impacto de la genética de los animales superiores en los rebaños (3).

La aplicación de estas dos biotecnologías reproductivas en los rebaños bovinos del cantón Macas, y otros cantones ganaderos del país, podría generar grandes beneficios en el esfuerzo de obtener animales altamente productivos y con adecuada eficiencia reproductiva. Esto sin lugar a dudas, se reflejará en mayor producción de carne y leche de excelente calidad para suplir las necesidades alimenticias de la población del país.

### **3 BENEFICIARIOS DEL PROYECTO**

#### **3.1 Directos**

- El propietario de la finca.
- Los estudiantes de la carrera de Medicina Veterinaria y la Universidad Técnica de Cotopaxi.
- También será beneficiaria directa la autora de la investigación, la cual se desarrolló para cumplir con el requisito previo a la obtención del título de graduación.

#### **3.2 Indirectos**

- Ganaderos del cantón Macas y del país que se dedican a la producción de carne
- Profesionales agropecuarios que trabajan en fincas ganaderas de carne
- Estudiantes de otras universidades del país

### **4 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

La ganadería en los trópicos enfrenta graves problemas debido a los altos costos de producción, a los cruzamientos no planificados y la deficiente eficiencia reproductiva (1). Ecuador no escapa a esta problemática, por lo que es necesario implementar estrategias para mejorar los sistemas de producción bovina, independientemente si están orientados a la producción de lecha o de carne (2).

Las biotecnologías reproductivas se fueron desarrollando durante décadas en respuesta a la necesidad de mejorar la eficiencia reproductiva de los rebaños bovinos y de maximizar el número de crías que un macho o hembra puede producir durante su vida útil, particularmente si se trata de ejemplares del alto valor genético (3). Incluso, con las biotecnologías reproductivas disponibles actualmente es posible conservar gametos y embriones durante décadas y obtener descendientes de animales genéticamente superiores muchos años después de su desaparición física (4).



La multiovulación o superovulación y transferencia de embriones son biotecnologías que comenzaron a usarse intensamente a mediados de la década de 1970 (4). Estas consisten en la aplicación de un tratamiento hormonal con la finalidad de estimular el crecimiento de numerosos folículos e inducir su ovulación, por un lado, que luego de una inseminación artificial convencional o a tiempo fijo producen gran cantidad de embriones que son transferidos a vaca receptoras, por otro (5). Los tratamientos de superovulación fueron perfeccionados a través del tiempo, y en la actualidad la combinación de un protocolo de sincronización de la ovulación con la administración de dosis decreciente de FSH (6), obtenida de extractos purificados de glándula hipófisis, ha hecho posible optimizar la producción de embriones transferibles (7).

Actualmente es posible aplicar tratamientos superovulatorios con una sola dosis de FSH, contenida en un vehículo de liberación lenta que garantiza la acción hormonal durante varios días, sin necesidad de movilizar las vacas donadoras dos veces al día por 4 días, disminuyendo costos y las situaciones estrés en los animales que pueden causar respuestas superovulatorias deficientes (8). Asimismo, la disponibilidad de productos con FSH recombinantes y más eficientes en su acción, así como de la aplicación de una dosis única por vía epidural, ha simplificado el protocolo superovulatorio y mejorado su efectividad (9).

Una década después, la posibilidad de producir embriones *in vitro* a partir de ovocitos colectados de varios postmortem se hizo realidad (4). Luego de implementarse el uso rutinario de la aspiración folicular guiada por ultrasonido, pocos años después (10), fue también posible hacerlo de ovarios de vacas vivas. Con la mejora de la eficiencia de los sistemas de producción *in vitro* de embriones (11) esta tecnología comenzó a aplicarse a gran escala en fincas bovinas de carne y de leche en muchos países del mundo (12). A tal punto ha sido así, que desde hace unos años la transferencia de embriones producidos *in vitro* ha sobrepasado los producidos por superovulación y transferencia de embriones (13).

Aunque la superovulación y la transferencia de embriones ha sido empleada durante algunos años en Ecuador (14, 15), la producción *in vitro* de embriones se ha utilizado muy poco y hay pocos laboratorios comerciales operativos, aunque hay un gran potencial para aplicar esta biotecnología en los rebaños bovinos del país.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 General**

Comparar la preñez de vacas receptoras luego de la transferencia de embriones *in vivo* y embriones *in vitro* producido por vacas Charoles en Macas

### **5.2 Específicos**

- Determinar la tasa de preñez de vacas receptoras transferidas con embriones producidos *in vivo* e *in vitro*.
- Determinar cuál de las técnicas de producción de embriones es más efectiva en las condiciones ambientales y en el ganado de Macas
- Evaluar la relación costo-beneficio de las dos biotecnologías reproductivas usadas para la producción de embriones en Macas

## **6 FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA**

### **6.1 Generalidades**

Las biotecnologías reproductivas son técnicas que tienen como propósito mejorar el desempeño reproductivo de los rebaños e incrementar su calidad genética. Se han aplicado durante varias décadas, y su impacto sobre la producción de leche y de carne del ganado bovino es innegable (3).

Para comprender todos los aspectos relacionados con estas biotécnicas es necesario tener claro los aspectos morfológicos y fisiológicos que fundamentan la función reproductiva de los bovinos. Para ello, en las siguientes páginas se hará una descripción detallada de estos aspectos.

### **6.2 Fisiología reproductiva**

Las bases fisiológicas de la reproducción incluyen aspectos morfológicos, fisiológicos y endocrinos relacionados con la actividad reproductiva de los animales. La ciclicidad reproductiva de los bovinos y otras especies de animales de granja implica la participación de varios componentes anatómicos y funcionales localizados en diferentes niveles del organismo animal. Estos componentes conforman el eje reproductivo (Grafico 1) constituido por el hipotálamo, la hipófisis, los ovarios y el útero. La acción coordinada de estos componentes hace posible que las vacas experimenten ciclos estrales, ovulen y eventualmente queden preñadas y den nacimiento a una cría sana (16).

#### **6.2.1 Ciclo estral**

El ciclo estral es el periodo de tiempo que transcurre entre un celo y el siguiente. En la vaca tiene una duración de aproximada de 21 días y un rango entre 18 y 24 días (17). Consta de dos etapas, dependiendo de las estructuras ováricas y las hormonas predominantes: fase folicular y fase luteal. La fase folicular inicia con la regresión del cuerpo lúteo (CL) y finaliza con la ovulación. Durante esta fase ocurre la maduración folicular, por lo que el esteroide gonadal dominante es el estradiol (17). La fase luteal comienza luego de la ovulación, con la transformación del folículo colapsado luego de la liberación de ovocito, en un cuerpo hemorrágico que progresivamente se va convirtiendo

en un CL, que entre los días 4 y 12, aproximadamente, se constituye en una glándula endocrina transitoria que produce grandes cantidades de progesterona (P4), imprescindible para el mantenimiento de la preñez en la vaca (16).

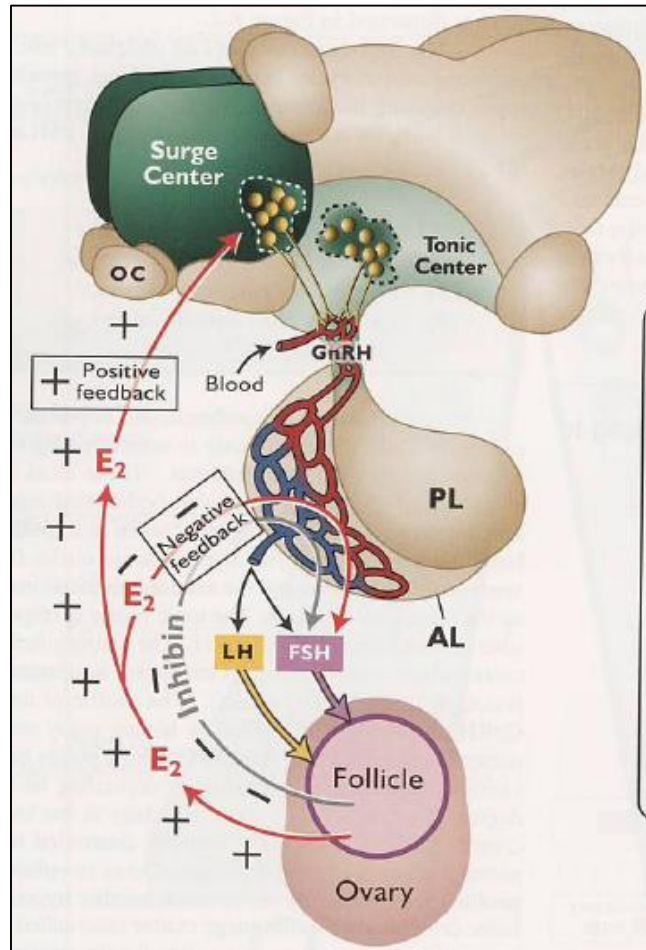


Figura 1. El eje reproductivo en los bovinos [Fuente: (16)].

A su vez, de acuerdo a las características endocrinas, estructurales, histológicas del endometrio uterino y conductuales que manifiestan las hembras bovinas, el ciclo estrual se divide en 4 etapas: 1) metaestro, 2) diestro, 3) proestro y 4) estro. Las dos primeras están incluidas en la fase luteal, y la tercera y cuarta en la fase folicular (17).

### 6.2.1.1 Metaestro

Esta etapa se inicia luego de la ovulación y concluye en el momento en que hay un cuerpo lúteo funcional bien establecido. Tiene una duración que puede variar entre 1 y 4 días. Corresponde al periodo de transición entre la predominancia estrogénica del ciclo anterior

y el incremento en las concentraciones de progesterona del ciclo estral en curso. Durante esta fase, el CL que se desarrolla desde una estructura inicial denominada cuerpo hemorrágico a otra estructura con gran importancia funcional denominada CL. Este proceso, así como la actividad funcional del CL, ocurre bajo influencia de la hormona luteinizante (LH) producida y liberada desde la glándula hipófisis. Como se indicó anteriormente, el CL se forma a partir del folículo colapsado luego de la ovulación, de manera que las células de la granulosa y de la teca interna del folículo ovulado experimentan un proceso de luteinización y diferenciación en células esteroidogénicas lúteas grandes y chicas, respectivamente. Estas células proliferan y llenan toda la cavidad remanente luego de la ovulación y producen cantidades crecientes de P4 hasta el final del diestro, cuando ocurre la regresión del cuerpo lúteo o luteólisis (16).

Entre lo eventos importantes que suceden en el metaestro está el surgimiento de la primera onda folicular (Figura 2). El estradiol y la inhibina disminuyen súbitamente después de la ovulación, permitiendo el incremento en las concentraciones de FSH que causan el reclutamiento de la primera oleada de folículos que crecen y de los cuales se origina el folículo dominante de la primera onda, al inicio del diestro.

#### **6.2.1.2 Diestro**

Esta es la etapa más larga del ciclo estral y se caracteriza por la máxima actividad funcional del CL, que produce grandes cantidades de P4 (Figura 2). En los animales la P4 es necesaria para crear las condiciones fisiológicas adecuadas para la implantación, y luego de ello, para estimular el desarrollo embrionario, la placentación y el mantenimiento de la gestación. En los bovinos el diestro tiene una duración de 10 a 12 días y se extiende aproximadamente desde el día 4 o 5 del ciclo estral hasta el momento en que las concentraciones episódicas crecientes de la prostaglandina F2alfa ( $PGF2\alpha$ ) desencadena la luteólisis o muerte funcional y estructural del CL, aproximadamente entre los días 17 y 18 del ciclo estral. Durante esta fase, la P4 alcanza sus máximas concentraciones y suprime la liberación de LH debido a que inhibe la secreción de GnRH en el hipotálamo y la formación de receptores de GnRH en las células gonadotropas de la hipófisis (16).

Durante este periodo, la P4 estimula la actividad secretora del endometrio con la finalidad de iniciar una posible gestación; adicionalmente, el cérvix se cierra y se reduce la secreción de moco cervical y vaginal, el cual adopta una apariencia pegajosa y opaca para impedir el paso de microorganismos al útero (16).

Al final del diestro, los estrógenos foliculares han sensibilizado al endometrio para que forme receptores a oxitocina, y a su vez, la P4 ha subregulado sus propios receptores en el tejido luteal. Se inicia la secreción episódica de  $\text{PGF}_2\alpha$  que alcanza niveles tales que los mecanismos luteoprotectores del CL no pueden contener, inclusive los que ejerce la misma P4. Debido a ello, la  $\text{PGF}_2\alpha$  desencadena el proceso de regresión del cuerpo lúteo, que involucra una fase inicial aguda que suprime la capacidad funcional del CL, y otra más lenta de destrucción del tejido luteal hasta ser sustituido por tejido fibroso. Sin embargo, ante la presencia de un embrión en el endometrio, el mecanismo de luteólisis es evitado por la producción de factores luteotrópicos como la prostaglandina E2 ( $\text{PGE}_2$ ) y la disminución de la secreción de  $\text{PGF}_2\alpha$  por el endometrio (16).

Durante esta fase se ocurre el reclutamiento de la segunda onda folicular, cuyo folículo dominante no logra alcanzar el estatus ovulatorio, debido a que las elevadas concentraciones de P4 mantienen suprimida la secreción pulsátil de LH. Ante esa circunstancia, de no producirse la luteólisis durante la fase estrogénicamente activa del folículo dominante de la segunda onda, que permitiría que este respondiera al incremento de la pulsatilidad de la LH en respuesta a la supresión de la P4, se inicia una tercera onda de crecimiento folicular que producirá el folículo ovulatorio del ciclo estral en curso (17).

### **6.2.1.3 Proestro**

Esta fase comienza cuando ocurre la regresión del cuerpo lúteo, y tiene una duración de 2 a 3 días (días 18 - 21). Durante este periodo las concentraciones de progesterona disminuyen, y en consecuencia el bloque de esta hormona en el hipotálamo e hipófisis desaparece, y la LH aumenta la frecuencia y la amplitud de los pulsos. En respuesta a ello aumenta la producción de estradiol por el o los folículos que comenzaron su desarrollo durante el diestro. Uno de ellos, el que esta morfológica y funcionalmente mejor capacitado responde a la LH produciendo más estradiol y se convierte en un folículo preovulatorio. La duración del proestro está determinada por el grado de desarrollo en el

que se encuentre el o los folículos inmediatamente luego de la luteólisis. El final de esta etapa coincide con el inicio de la receptibilidad sexual (16).

En esta fase, la creciente producción de estrógenos folicular inicia la preparación del aparato reproductivo para el apareamiento. El útero se aprecia agrandado y edematoso, y las glándulas endometriales aumentan de tamaño, por lo cual se dice que entran en una fase proliferativa (17).

#### **6.2.1.4 Estro**

El estro es la etapa de receptividad sexual o calor, cuando la hembra busca activamente al macho, acepta la monta y el apareamiento. En el ovario el o los folículos en desarrollo alcanzan su madurez y tamaño ovulatorio, produciendo las máximas concentraciones de estradiol (E2), debido al mecanismo de retroalimentación positiva entre este esteroide gonadal y la LH, de modo que se produce la descarga ovulatoria de LH/FSH (hormona folículo estimulante), responsable de desencadenar la ovulación. En los bovinos la ovulación toma lugar en el metaestro del ciclo estrual subsiguiente (Figura 2) (16).

Los estrógenos son los responsables de inducir la conducta sexual. Sus signos más característicos son: inquietud, aumento de la locomoción, vocalizaciones e inapetencia; sin embargo, el que es considerado como definitivo es la inmovilidad frente al macho para aceptar la cópula (17).

El estradiol también produce cambios fisiológicos en el aparato reproductivo que tienen la finalidad de atraer al macho, estimulando la cópula y la posterior fertilización, una vez que curre la monta. El endometrio aumenta la síntesis de proteínas produciéndose una secreción abundante que ayudará a la capacitación espermática. Hay secreción de moco cervical y vaginal con apariencia líquida y cristalina, y se aprecia la apertura del cérvix. Durante esta etapa suceden contracciones de útero y oviducto con la finalidad de favorecer el transporte de los gametos para la fertilización (17).

### **6.3 Dinámica folicular**

Los folículos son entidades ováricas en cuyo interior se aloja el gameto femenino u ovocito, y que de acuerdo de su grado de desarrollo está conformado por varias

poblaciones de células. De modo que el primer estadio folicular es el primordial, que es seguido del primario, secundario, preantral y el antral. El desarrollo folicular ocurre en dos etapas: la inicial es independiente de las estimulo gonadotrópico y comprende el crecimiento de folículos desde los primeros estadios de desarrollo hasta que alcanza 3-4 mm de diámetro. La siguiente comprende el desarrollo de folículos a partir de 3-4 mm de diámetro hasta aquellos que alcanzan el estadio ovulatorio, y es regulada por las gonadotropinas. Esta última etapa se presenta en forma de oleadas de desarrollo folicular, que ocurre en tres fases (18): reclutamiento, selección y dominancia folicular.

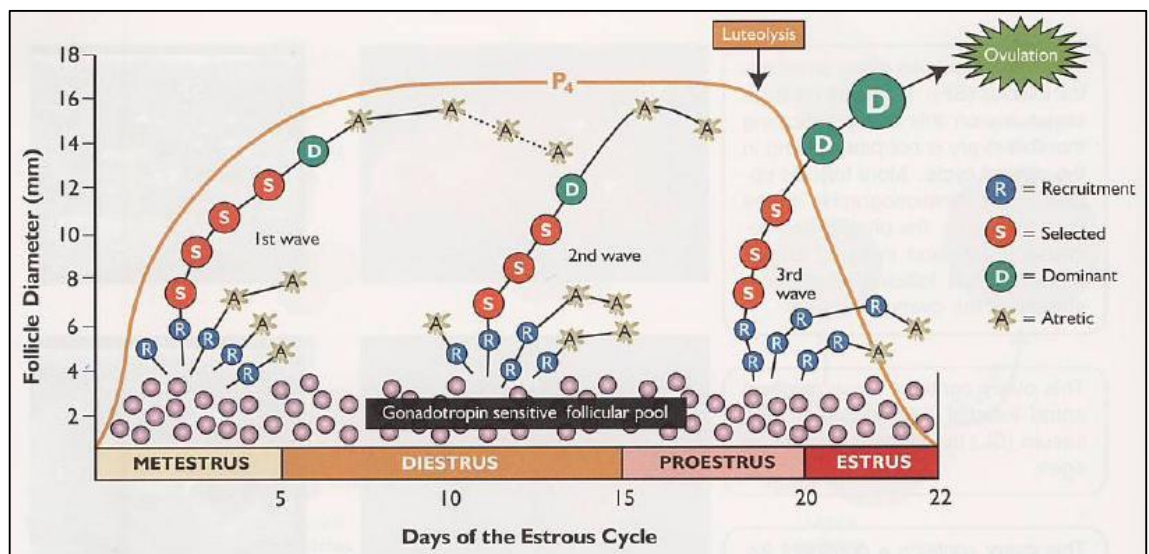


Figura 2. Modelo de crecimiento folicular en la vaca [Fuente: (16)].

### 6.3.1 Reclutamiento

El reclutamiento folicular es el evento a través del cual un grupo o cohorte de folículos comienzan a crecer en respuesta al estímulo de la FSH. Dependiendo del momento del ciclo estral en que ocurre la luteólisis y del estado de desarrollo en que se encuentra el folículo o los folículos de la segunda onda, el ciclo estral tendrá dos o tres eventos de reclutamiento folicular (19).

### 6.3.2 Selección

Es el proceso por el cual el folículo funcionalmente mejor dotado para crecer en un medio con bajos niveles de gonadotropinas (principalmente FSH), crece a un ritmo mayor que los demás folículos de su cohorte, evitando la atresia o regresión folicular, y tiene la



posibilidad de alcanzar el estadio ovulatorio si recibe un estímulo gonadotrópico adecuado (19). La circunstancia endocrina anterior ocurre luego que la concentración de P4 disminuye abruptamente durante las primeras horas de la luteólisis, y desaparece el bloqueo que esta hormona ejerce sobre el eje hipotalámico-hipofisiario, y se reestablece el patrón de secreción de la LH compatible con la maduración final del folículo dominante y la ovulación. Dependiendo del estatus funcional de los folículos presentes en los ovarios cuando disminuye la concentración de P4 durante la regresión luteal, será el folículo dominante de la segunda o tercera onda folicular el que alcance la ovulación, una vez iniciado el metaestro del ciclo estral siguiente (Figura 2) (16).

### **6.3.3 Dominancia folicular**

La dominancia folicular sucede cuando el folículo ovárico es capaz de crecer a un ritmo mayor de los demás folículos de su cohorte y alcanza un diámetro aproximado de 10 mm. Este evento es señal de que este folículo escapó a la atresia, es de mayor tamaño que los demás, y secreta cantidades importantes de E2 e inhibina (16). Estas dos hormonas producidas por el folículo dominante suprimen el reclutamiento de una nueva onda folicular e inhibe el crecimiento de los demás folículos de su cohorte. Cuando el folículo dominante encuentra el estímulo hormonal adecuado (bajos niveles de P4 y alta frecuencia de pulsos de LH), es capaz de ovular. Sin embargo, cuando el folículo dominante llega a la fase de dominancia durante el diestro, periodo en que existen altos niveles de P4, y por lo tanto la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH no es la adecuada para estimular el crecimiento y maduración folicular y la ovulación, el folículo dominante entra en una fase estática en la que no crece y se atresia poco después (16). Como consecuencia, las concentraciones de E2 e inhibina decrecen a niveles basales, el efecto supresor que estas hormonas ejercen sobre la FSH disminuye o desaparece, y un nuevo aumento transitorio de FSH estimula la emergencia de una nueva cohorte de folículos, de la cual se originará el próximo folículo dominante (19).

## **6.4 Biotecnologías reproductivas en los bovinos**

La biotecnología es la aplicación de tecnologías a los sistemas biológicos u organismos vivos para obtener o modificar productos o procesos que benefician al ser humano. Cuando estas se aplican en la reproducción se convierte en herramientas por medio de las

cuales se puede aumentar la eficiencia reproductiva y la calidad genética de los animales, pudiéndose cumplir con los principios del uso eficiente y racional de los recursos (4).

Las biotecnologías reproductivas son numerosas y han ido surgiendo y desarrollándose progresivamente a lo largo del tiempo. La primera de estas biotécnicas es la inseminación artificial (IA) que, sin lugar a dudas, ha sido la que más beneficios ha producido en la ganadería bovina mundial (4). Sin embargo, aunque esta técnica permite la difusión masiva del material genético de los sementales bovinos, no es posible obtener más de una cría al año de las vacas con alto mérito genético. Así, tratando de maximizar la genética de las hembras se desarrolló la técnica de múltiple ovulación y transferencia de embriones [conocida internacionalmente como MOET; (20)]. Esta técnica requiere que las vacas de alto mérito genético sean sometidas a tratamientos hormonales de estimulación ovárica con el fin de producir el crecimiento y la ovulación de numerosos folículos. Luego estas son inseminadas con semen de toros de alto valor genético y los embriones resultantes recolectados del útero, y colocados en el útero de vacas o vaquillas receptoras, mediante la técnica de IA (en este caso no se deposita semen en el útero, sino un embrión en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo) (5).

El control hormonal del ciclo estrual de los bovinos es otra biotecnología desarrollada para mejorar de la eficiencia reproductiva de los rebaños que, combinada con otras biotécnicas reproductivas, como la IA a tiempo fijo (IATF), la MOET, fecundación in vitro (FIV), la aspiración folicular guiada por ultrasonido (ovum pick-up u OPU) y la criopreservación de gametos y embriones ha sido fundamental en la mejora genética de los rebaños bovinos a nivel mundial (Figura 3) (4).

<b>GENERACIÓN</b>	<b>Primera</b>	<b>1908</b>
	Inseminación artificial	
	<b>Segunda</b>	<b>1970</b>
	Control hormonal de la ovulación Multiovulación y trasplante de embriones	
	<b>Tercera</b>	<b>1970</b>
Sexado de embriones y espermatozoides (1983) Producción in vitro de embriones (1987)		
<b>Cuarta</b>	<b>1908</b>	
Clonación con células somáticas		
<b>Quinta</b>	<b>2000</b>	
Transgénesis		

Figura 3. Desarrollo generacional de las biotecnologías reproductivas. [Fuente: Modificado de (4)].

Poco años después surgió la FIV, biotecnología reproductiva que consiste en madurar artificialmente los ovocitos obtenidos *postmortem* o *in vivo* en un medio de especializado de maduración, para luego ser puestos en un medio de fecundación junto con espermatozoides, y los presuntos cigotos cultivados en condiciones controladas de temperatura, humedad, nitrógeno y CO<sub>2</sub> (21). Al final de este periodo muchos de los embriones habrán alcanzado el estadio de blastocistos, y podrán ser transferidos o criopreservados. Todas estas etapas se llevan a cabo en un laboratorio especializado dotado de numerosos equipos, instrumentos e insumos necesarios para cumplir con estos procesos (21).

Posteriormente, el desarrollo de la OPU permitió, de una forma bastante práctica, la obtención de ovocitos de vacas vivas (22), con lo cual la diseminación del germoplasma de vacas de alto valor genético se incrementó enormemente, sin la necesidad de someter a estas hembras a tratamientos hormonales frecuentes. Asimismo, otra biotecnología desarrollada y usada ampliamente en los bovinos y otras especies de interés productivo, la criopreservación, ha permitido conservar grandes cantidades de embriones y gametos de animales genéticamente superiores (23), así como también de animales de especies en riesgo de extinción (24).

## **6.5 Multiovulación y transferencia de embriones**

La multiovulación o superovulación y la transferencia embrionaria son dos biotécnicas reproductivas ampliamente usadas en los bovinos, que han hecho grandes contribuciones a la industria lechera y cárnica mundial (12). La primera tiene como propósito estimular la ovulación de numerosos folículos y la producción de numerosos embriones, en respuesta a la aplicación de hormonas gonadotrópicas. Generalmente este procedimiento se realiza en vacas donadoras de embriones con alto mérito genético y excelente desempeño reproductivo (5). Mediante la segunda biotécnica, los embriones resultantes, luego de una IA a tiempo fijo o a celo detectado, son recuperados mediante el método de lavado uterino, inmediatamente evaluados al microscopio, y los de mejor calidad transferidos a hembras receptoras (vaquillas o vacas), las cuales deben estar en el mismo día del ciclo estral que las vacas donadoras, generalmente en el día 7 del ciclo (5). Esto garantiza que haya una sincronía entre el desarrollo embrionario y las condiciones microambientales del útero receptor al momento de transferirse el embrión.

Los programas MOET comenzaron a aplicarse con gran intensidad a inicios de la década de 1970 en países como USA, Canadá y en Europa. Su auge fue tal que a mediados de esa década se fundó la Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria (International Embryo Technology Society; IETS) (25), cuyo propósito fue reglamentar el uso y difundir los logros de la aplicación de estas biotecnologías a nivel mundial. La posibilidad de mejoramiento genético, de controlar la diseminación de enfermedades, y de comercializar embriones entre países garantizó la aplicación exitosa de estas biotecnologías por varias décadas (26).

En Ecuador los programas MOET comenzaron en el año de 1981, primero con numerosas conferencias en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador. Luego en el año de 1985 se realizaron transferencias con embriones frescos en ganado vacuno y empezaron a nacer los primeros terneros con este trabajo. En 1987 nacieron en Ecuador dos terneros como resultado de la transferencia de embriones congelados.

### 6.5.1 Protocolos de superovulación

La superovulación consiste en la estimulación ovárica mediante la aplicación de gonadotropinas, las cuales estimulan el crecimiento y ovulación de numerosos folículos en un rango muy corto de tiempo (27). Los primeros protocolos de superovulación consistieron en administrar parenteralmente la hormona gonadotropina coriónica equina (eCG) en el periodo de transición entre las fases luteal y folicular, aproximadamente en el día 16 del ciclo estral (Bo & Mapletoft, 2014). La incorporación de la  $PGF2\alpha$  en los protocolos de multiovlación hizo posible comenzar el tratamiento de estimulación ovárica en cualquier momento del ciclo estral (7), comprobándose mejores resultados cuando la eCG se aplicaba entre los días 8 y 12 del ciclo estral (28).

Posteriormente, los extractos de glándula hipofisiaria que contenían FSH y LH, pero proporcionalmente más de la primera gonadotropina que de la segunda, mostraron mejores resultados que la aplicación de eCG (29). A diferencia de la eCG que tiene una vida media más larga (hasta 10 días) y solo es necesario aplicar una sola dosis, la FSH de los extractos purificados de hipófisis tiene una actividad biológica menor a 5 horas, por lo cual es necesario administrar dos dosis diarias de hormona para lograr una respuesta superovulatoria efectiva (30). Normalmente se aplican dos dosis diarias de FSH por cuatro días, que decrecen cada día. La utilización de este protocolo en diferentes productos comerciales ha resultado satisfactoria para superovular vacas y novillas lecheras (31).

La combinación de extractos purificados de gonadotropinas con compuestos retardantes (por ejemplo, hyaluronan), es decir, con sustancia biodegradables inocuas para los tejidos, que permite la liberación lenta de la hormona, y por lo tanto, la aplicación de una sola dosis (intramuscular o subcutánea) de FSH, ha mostrado resultados satisfactorios (8). Aunque estos resultados no fueron mejores que los obtenidos con dosis decrecientes de FSH, simplifica el manejo de las donadoras y reduce el estrés causante de respuestas superovulatorias deficientes (8). En años recientes, la administración epidural de una sola dosis de FSH resultó en un desarrollo folicular comparable y una colección similar de blastocistos que el protocolo superovulatorio tradicional (9), lo cual también constituye una alternativa para simplificar el manejo y causar menos estrés en las vacas donadoras.

Generalmente los tratamientos de superovulación se combinan con protocolos de sincronización del celo y la ovulación, con el fin de estimular la emergencia de un pool de folículos que crecerán a un ritmo similar, y para tener la posibilidad de inseminar las vacas donantes en un momento determinado sin necesidad de detectar el celo, es decir aplicar la IATF (Figura 4) (32).

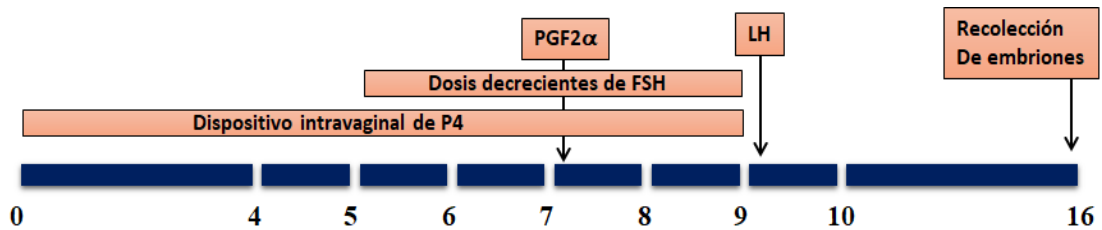


Figura 4. Esquema del protocolo de superovulación P-36 [Fuente: Modificado de (32)].

## 6.6 Producción *in vitro* de embriones

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) bovinos es una biotecnología que consiste en la producción de embriones transferibles en condiciones *in vitro*, es decir en un laboratorio, a partir de ovocitos recolectados de ovarios postmortem (generalmente de un matadero) o de animales vivos (vacas donadoras), esta última a través de la aspiración folicular guiada por ultrasonido (33). Una vez en el laboratorio, la técnica implica el uso de diferentes equipos (incubadoras, cámaras de flujo laminar, centrifuga, etc.), instrumentos (micropipetas de precisión, pH-metro, osmómetro, microscopio), reactivos (sustancias químicas, hormonas, etc.) e insumos (material descartable, de vidrio, etc.), así como también de un protocolo estandarizado de PIVE (21). La PIVE se lleva a cabo en tres etapas consecutivas: maduración (MIV) y fecundación *in vitro* (FIV) de ovocitos y cultivo *in vitro* (CIV) de embriones (21). Estos aspectos serán descritos con detalle en las siguientes páginas.

Durante los últimos 15 años la PIVE ha ido cobrando importancia con respecto al sistema MOET (12), de manera que del total de embriones trasferibles colectados o producidos en el mundo ( $n=1.487.343$ ) en el año 2017, 33,3% fueron embriones producidos por MOET ( $n=495.054$ ) y 66,7% fueron producidos por PIVE ( $n=992.289$ ) (13). Aunque los porcentajes de preñez son algo menores en la PIVE que en MOET, la cantidad de preñeces

que se pueden lograr por vaca donadora durante un periodo de tiempo determinado es mayor en la primera que en la segunda.

### **6.6.1 Maduración *in vitro***

Para la MIV se colectan los complejos ovocitos-células del cumulo (el ovocito rodeado de una masa compacta de células del cúmulo oóforo) (COCs) de los ovarios (*postmortem* o *in vivo*), y se cultivan en un medio especializado con una composición de sustancias similar a las encontradas en el fluido oviductal (34). Luego de estar 24 horas en una incubadora a 38.5 °C, 5% CO<sub>2</sub> en aire y una humedad de saturación (35), se completa la maduración nuclear, durante la cual el ovocito avanza del estadio de profase de la meiosis I al de metafase II de la segunda división meiótica (21). Asimismo, los ovocitos experimentan un proceso de maduración citoplasmática que consiste en el almacenamiento de lípidos, distribución de mitocondrias y ribosomas, reducción de aparatos de Golgi y migración de los gránulos corticales (36). Otro hecho importante es que las células del cúmulo que rodeaban firmemente al ovocito antes de la maduración, debido a que estaban fuertemente unidas entre ellas y al ovocito, luego de la maduración sus uniones se hacen laxas y las células de cumulo se observan más separadas, y en general el cumulo oóforo más expandido.

### **6.6.2 Fecundación *in vitro***

En la siguiente etapa los COCs son coincubados con espermatozoides en otro medio especializado, el medio de fecundación, por un periodo entre 18 y 24 horas en un ambiente a 38.5°C, con un 5% CO<sub>2</sub> en aire y humedad de saturación (34). No obstante, antes de inseminar las gotas de medio de fecundación donde están los COCs, los espermatozoides deben ser capacitados y sometidos a un procedimiento de selección, con la finalidad de obtener espermatozoides libres de plasma seminal y de restos de diluyente, y con una motilidad lineal progresiva no inferior a 70% (37). Aunque se han usado mayormente dos métodos para seleccionar los espermios, tales como como el *swim up* y gradiente de percoll (37), en la actualidad existen productos comerciales como el Bovipure® y Puresperm® que ha demostrado ser muy efectivos (35). Si bien hay disponibles varias sustancias para inducir la capacitación espermática, la heparina es ampliamente usada en

los laboratorios comerciales de fecundación *in vitro* (FIV) por su potente efecto inductor de la capacitación (34).

### **6.6.3 Cultivo *in vitro***

Luego del periodo de FIV, los presuntos cigotos son transferidos a un medio de cultivo de embriones en el que permanecen durante 6 días consecutivos. Este medio es un poco más complejo que los anteriores y su composición es muy similar a la del fluido uterino (34). Durante este periodo ocurre el desarrollo embrionario temprano desde el estadio de cigoto al de blastocisto, a través de un proceso de segmentación o clivaje. Cada célula del embrión se denomina blastómera y su tamaño disminuye conforme avanza la división celular, sin afectar el tamaño del embrión hasta el estadio de blastocisto. Durante los primeros días, el desarrollo embrionario está regulado por ARN mensajeros de origen materno y por proteínas producidas y almacenadas durante el desarrollo folicular (38). Sin embargo, el embrión comienza a sintetizar sus propios transcritos y proteínas luego que ocurre la activación del genoma embrionario, en un estadio embrionario entre 8 y 16 blastómeras (38).

En la medida que avanza el proceso de segmentación, las blastómeras ubicadas en la periferia del embrión se aplanan y comienzan a producir proteínas asociadas a uniones intercelulares más cercanas, que causa que las blastómeras estén más estrechamente unidas entre sí, particularmente en el estadio de mórula (embrión de 16 a 32 células) compacta (39). Las células de la periferia desarrollan uniones estrechas y oclusivas (tight junctions) que reducen la permeabilidad de fluidos y en un estadio posterior formaran el trofoblasto. Las células del interior del embrión forman uniones gap (gap junctions) que maximizan la comunicación intercelular, y posteriormente formarán la masa celular interna (39). A partir de este momento, las blastómeras comienzan a producir fluido que se deposita en el interior del embrión formando una cavidad denominada blastocele, y dos poblaciones de células bien diferenciadas: 1) una capa envolvente de células o trofoblasto del cual se origina el corion y el amnios de la placenta, y un conglomerado de células en uno de los polos que se conoce como masa celular interna, y de la cual se deriva el embrión propiamente dicho. Es ultimo estadio embrionario se denomina blastocisto, y es durante el cual los embriones son transferidos a hembras receptoras (39).



El CIV es la fase más larga y crítica del todo el proceso de PIVE, ya que, aunque un alto porcentaje de ovocitos maduran y clivan después de la fecundación, solo entre 20 y 40% de embriones alcanzan el estadio de blastocistos (40). En el día 7 posterior a la FIV, o sexto día de cultivo, los embriones son evaluados en un microscopio con el fin de establecer su grado desarrollo, y de acuerdo a ello se categorizan en mórulas, blastocistos tempranos, blastocistos regulares, blastocistos expandidos y blastocistos protruidos (41). Únicamente los blastocistos de grado 1 y 2 son transferidos a vacas receptoras.

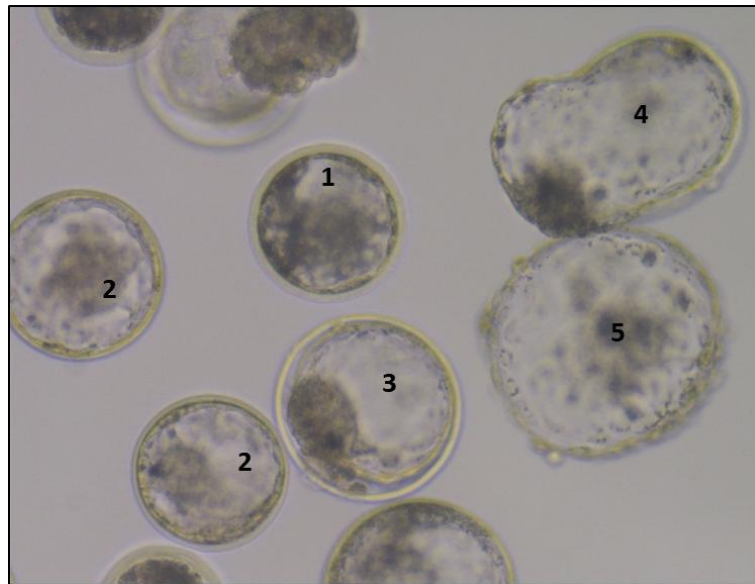


Figura 5. Blastocistos en diferentes estadios de desarrollo: 1: blastocisto temprano; 2: blastocisto regular; 3: blastocisto expandido; 4: blastocisto en proceso eclosión de la zona pelúcida; 5: blastocisto eclosionado o libre de la zona pelúcida. [Fuente: (37)].

## 6.7 Selección de hembras donantes y receptoras

### 6.7.1 Donantes

Independientemente de si se trata de vacas donadoras de embriones in vivo (por MOET) o de ovocitos para PIVE, la selección de vacas donadoras es un evento importante. La principal motivación para que una vaca sea candidata para donadora de embriones u ovocitos es que sea un ejemplar elite de la finca (5). La estrategia es usar vacas genéticamente superiores para que los genes relacionados con su capacidad productiva, desempeño reproductivo, longevidad, resistencia a enfermedades etc., se transmitan a la descendencia y contribuyan a mejorar el desempeño de la siguiente generación del rebaño (42).

El desarrollo de la tecnología genómica ha permitido identificar la identificación de los bovinos genéticamente superiores a los pocos días de nacidos, así como también descartar los animales que, aunque sean de alto valor económico, portan en su genotipo genes relacionados con enfermedades genéticas transmisibles a la descendencia. La tecnología genómica, por lo tanto, posibilita el progreso genético más rápido de los rebaños bovinos (43).

Según (44) los criterios generales para selección de las donantes son los siguientes:

- Ciclos estrales regulares y que hayan alcanzado la pubertad a temprana edad.
- Servicios por concepción  $\leq 2$  en su historial reproductivo.
- Comportamiento individual superior en las características de importancia económica.
- Crías superiores a la media del establecimiento, especialmente comparando con sus medios hermanos.
- No haber tenido problemas al parto o irregularidades reproductivas.
- Ningún defecto genético o deformación detectable.
- Edad entre 3 y 10 años.
- Historial de buena respuesta superovulatoria en programas anteriores.
- Buena condición corporal

### **6.7.2 Receptoras**

La selección de las hembras receptoras es de suma importancia para garantizar el éxito de un programa MOET o de FIV. Los embriones obtenidos por cualquiera de los métodos indicados anteriormente serán transferidos al útero de estas estas hembras, donde se desarrollan a lo largo de la gestación. El éxito de un programa MOET o PIVE es el nacimiento de tantas crías sanas como sea posible.

Las receptoras deben ser hembras reproductivamente sanas, ser capaces de llevar la gestación a término, poseer un tamaño que les permita parir sin grandes dificultades y tener buena capacidad lechera para alimentar al ternero de manera que este pueda expresar su potencial genético (42).

Los aspectos más relevantes relacionados con las receptoras que pueden afectar el resultado final en un programa de transferencia embrionaria. Entre estos factores figuran: la raza, estado nutricional, empleo reiterado, calidad del cuerpo lúteo y nivel de progesterona, sincronización de la fase del ciclo estral con respecto a la donante y al desarrollo del embrión (42). Las receptoras deben ser sometidas a un tratamiento hormonal para sincronizar la ovulación con el fin de que estén en el mismo día del ciclo estral que las vacas donadoras. Estos protocolos hormonales pueden variar en las hormonas usadas y momentos de aplicación, pero todos persiguen el propósito de sincronizar el celo y la ovulación (Figura 6).

### **6.8 Factores que afectan la preñez en programas de transferencia de embriones**

Irrespectivamente de si se trata de transferencias de embriones *in vivo* o *in vitro*, son varios los factores que pueden influenciar la tasa de preñez de las hembras receptoras (45). Oyuela y Jiménez (45), describen factores extrínsecos, como los ambientales, de manejo, administrativos y nutricionales (11, 46); los inherentes la donadora de embriones u ovocitos, como el diámetro del cuerpo lúteo y su capacidad para producir P4, la calidad del ovocito, la calidad del embrión y su estadio de desarrollo. También deben considerarse en esta categoría el grupo genético y la edad de la donadora (42, 47).

Asimismo, las hembras receptoras y el procedimiento de transferencia son determinantes del éxito de la tasa de preñez en programas MOET y PIVE. Entre los factores relacionados con la receptora se encuentran la edad, el estado nutricional, la raza, la época del año, así como también el lugar de deposición del embrión en el útero, y el grado de dificultad para completar la transferencia.

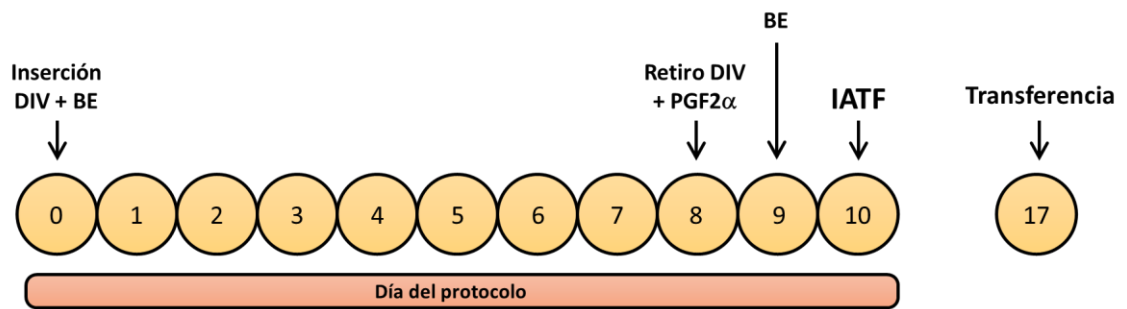


Figura 6. Protocolo de sincronización de la ovulación en vacas receptoras de embriones. [Fuente: (32)].

### Evaluación de embriones

La observación y clasificación de los embriones a ser transferidos es una fase crítica del proceso de MOET y PIVE. Este procedimiento se realiza con un estereoscopio para poder apreciar las características que permiten categorizar los embriones, dependiendo de su estadio de desarrollo, así como también valorar su calidad (48).

El manual de la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria describe los siguientes estadios de desarrollo embrionario (41), que sirve para la categorización de embriones producidos por ambas biotecnologías (48).

#### 6.8.1 Mórula

Se asemeja a una mora. Las blastómeras son difíciles de distinguir unas de otras. La masa de células (embrión) ocupa casi todo el espacio perivitelino (edad estimada de 5 días).

#### 6.8.2 Mórula compacta

Los blastómeros son unidad y constituyen una masa compacta que ocupa el 60-70% del espacio perivitelino

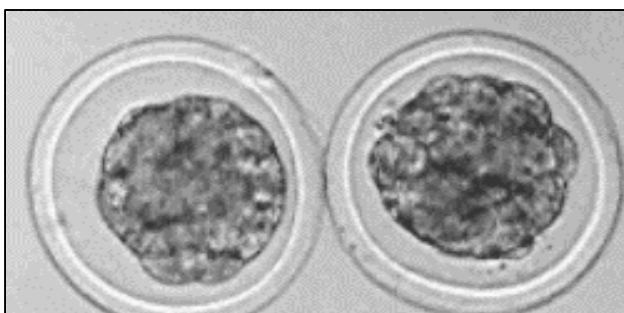


Figura 7. Mórula compacta [Fuente: (37)].

Según Palma (37), se caracteriza por el comienzo del transporte de fluido en las células trofoectodérmicas y por la formación de una cavidad (blastocele) en el interior del embrión, dando la apariencia de un anillo.

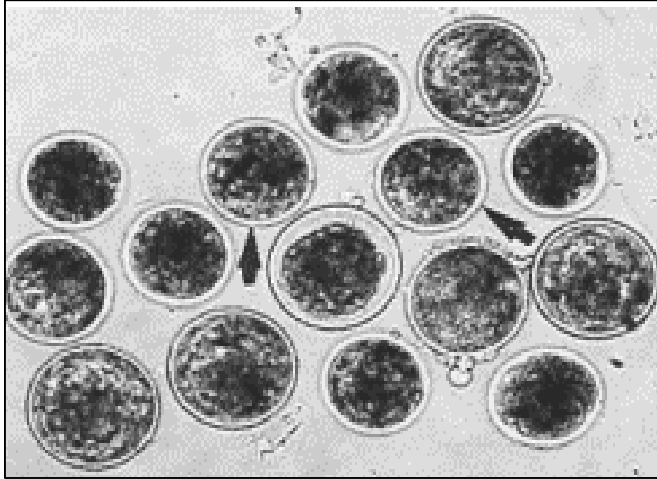


Figura 8. Blastocisto temprano [Fuente: (37)].

### 6.8.3 Blastocitos regulares

En este estadio existe una marcada diferenciación entre las células del trofoblasto, que constituyen una pared que se adosa a la zona pelúcida y la masa celular interna (o disco embrionario) más oscura (37).

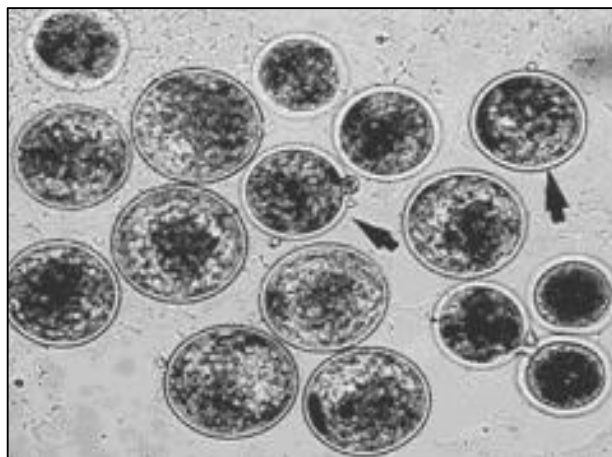


Figura 9. Blastocistos regulares [Fuente: (37)].

#### 6.8.4 Blastocitos Expandido

El diámetro del embrión aumenta considerablemente en este estadio, lo que causa adelgazamiento de la zona pelúcida a un tercio de su espesor original. La presión se incrementa en el interior del blastocisto y provoca la ruptura de la zona pelúcida, a través de la cual ocurre la protrusión del embrión (37).

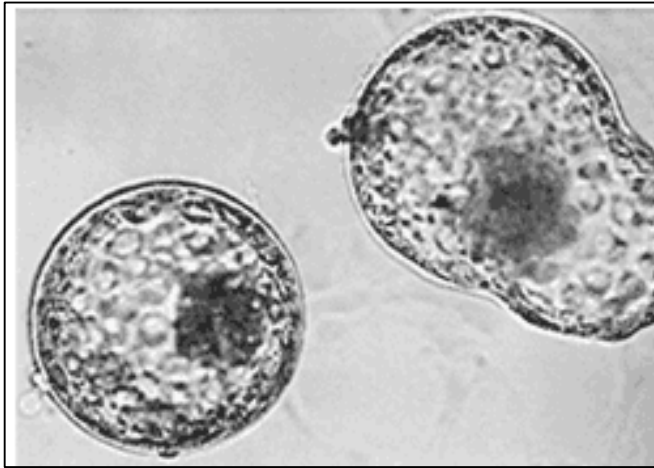


Figura 10. Blastocistos expandidos [Fuente: (37)].

#### 6.8.5 Blastocito Eclosionado

El embrión se encuentra en el exterior de la zona pelúcida. Luego el blastocisto experimenta una expansión.

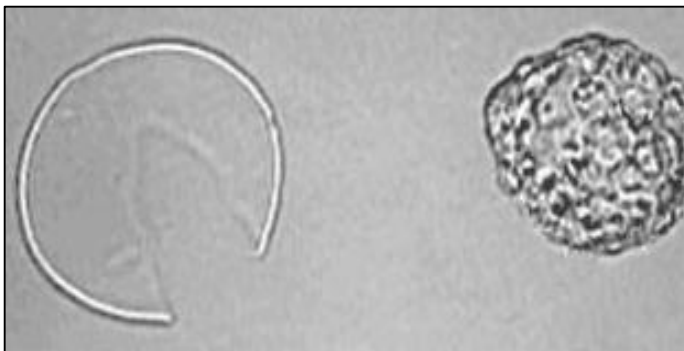


Figura 11. Blastocisto eclosionado [Fuente: Palma (37)]

## 6.9 Calidad del embrión

Asimismo, el manual de la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria describe las siguientes clasificaciones de acuerdo a la calidad de los embriones (41):

- **Calidad 1**

Excelente o buena. La masa celular interna es simétrica y esférica, con blastómeras bien definidas y uniformes en el tamaño, color y densidad. El desarrollo del embrión es consistente con la fase del desarrollo esperada. Al menos el 85% del material debe permanecer intacto dentro de la masa embrionaria. La zona pelúcida es lisa y no tiene ninguna irregularidad en su superficie (48).

- **Calidad 2**

Regular. Tiene irregularidades moderadas en la forma de la masa celular o en el tamaño, color y densidad de las blastómeras. Para considerar un embrión de calidad 2, al menos el 50% del conglomerado celular debe permanecer intacto dentro de la masa embrionaria (48).

- **Calidad 3**

Malo. Presenta irregularidades considerables en la forma de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las blastómeras. En este caso, al menos el 25% del material celular debe permanecer intacto dentro de la masa celular embrionaria (48).

- **Calidad 4**

Muertos, son embriones deformes, degenerados o con atraso en el desarrollo, así como también y óvulos no fecundados (48).

## 7 METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

### 7.1 Área de investigación

Esta investigación se llevó a cabo en la finca los Leones ubicada en la parroquia San Isidro, cantón Macas de la provincia Morona Santiago (Figura 13). El sector donde se localiza la finca abarca una superficie 53,3 km<sup>2</sup>, se encuentra a una altitud de 1030 msnm, y en la siguiente ubicación geográfica: longitud -78,11135 y latitud -2,30868. En el área predomina una temperatura media de 19°C y una humedad relativa de 86%.

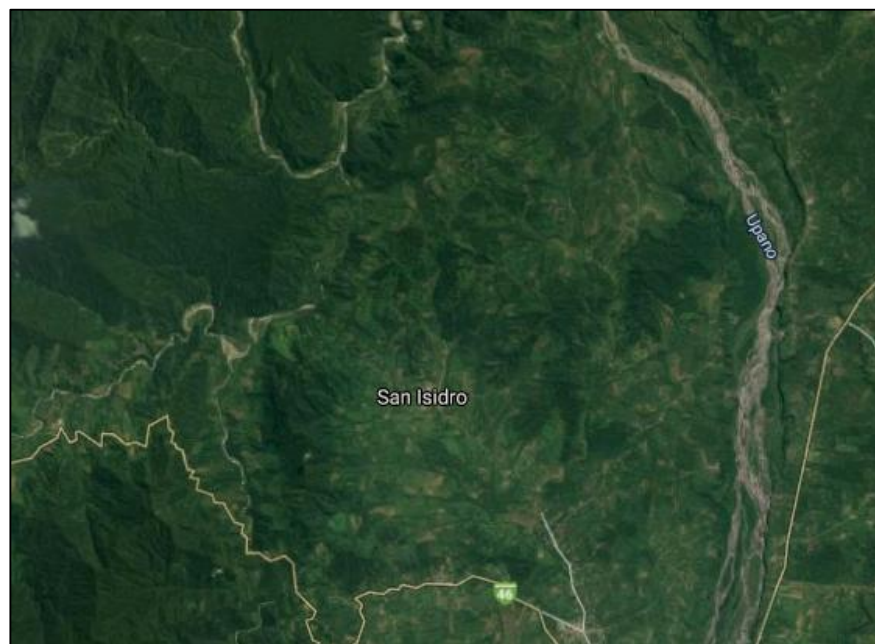


Figura 13. Área geográfica donde se ubica la finca los Leones [Fuente: (49)].

### 7.2 Materiales utilizados en la investigación

En la investigación se usaron numerosos recursos humanos, materiales, biológicos, instrumentos, equipos y material descartable, los cuales se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Materiales utilizados durante la investigación

Tipo de recurso material utilizado			
Material de oficina	Materiales para observar y seleccionar embriones	Materiales para transferencia	
Papel bond Bolígrafo	Estereoscopio con objetivos 10x – 20x	Pajuelas de 0,25 cc estériles para envasado	



Libreta de campo	1 pipeta de 10 micro litros para manipulación de embriones	Catéter I.M.V. para transferencia de embriones
Flash memory		
Impresora	Micro pipetas	Protectores Chemisse de 18 pulgadas
CD	Placas petri dish small	Lidocaína al 2%
Internet	Transformador de energía 210w	1 jeringa de 5ml
Laptop		Agujas de 18 G x 1''
Copias	Placas petri dish integrity cuadriculadas de 100 x 15 mm x 4	Guantes ginecológicos
Cámara	Placas petri dish multi web bowl	
	Jeringas de 5 cc con embolo plástico x 2	
	Guantes de manejo	

### 7.3 Vacas donadoras

Se utilizaron 6 vacas de raza Charolesa, 3 como donadoras de embriones in vivo, y 3 como donadoras de ovocitos. Estas vacas se manejaban a pastoreo en potreros de pasto gramalote (*Axonopus scoparius*) y tenían una condición corporal  $\geq 3.5$ . 5). Estaban clínicamente sanas y bajo un programa sanitario preventivo contra las principales enfermedades bacterianas, virales y parasitarias que afectan el ganado bovino de la región. Antes de iniciar el programa se sometieron a una desparasitación con Ivermec-JB (James Brown Pharma; Quito, Ecuador) y se les administró 20 ml de Catosal B12 (Equaquímica; Guayaquil, Ecuador) y 20 mL de un reconstituyente (Energimax; Innova Andina S.A., Ecuador).

#### 7.3.1 Selección de vacas donadoras

Se seleccionaron 3 vacas donadoras para producir embriones in vivo y 3 donadoras de ovocitos para producir los embriones *in vitro*, en ambos casos de raza Charolesa de la finca los Leones. La selección de estas hembras se basó en los siguientes aspectos: 1) mérito genético, 2) superioridad productiva en relación al promedio de la finca, 3) defectos genéticos o de conformación detectables, 4) historial de excelente eficiencia reproductiva y sin antecedentes reproductivos como abortos, retención placentaria o metritis, 5) excelente condición corporal y plan de alimentación adecuado

(suplementación mineral, vitaminas, etc.), 6) no haber estado en situaciones de estrés en las últimas semanas previas al inicio del programa.

### 7.3.2 Superovulación y producción de embriones *in vivo*

Las vacas se sometieron a un protocolo de sincronización del celo y ovulación, y de estimulación ovárica basado en la aplicación de dosis decrecientes de FSH por 4 días consecutivos. Para ello, las vacas fueron inmovilizadas y se les administraron las diferentes hormonas en la secuencia indiada en la Tabla 2.

Tabla 2. Protocolo de superovulación y sincronización de la ovulación en vacas donadora de embriones *in vivo* en la finca los Leones

Fecha	Hora	Procedimiento
13-12-20	6:00	Inserción del dispositivo intravaginal (CIDR; Zoetis AR; Argentina; 1.38 gr de P4) + 5 mg de benzoato de estradiol (Grafoléon NF; Lab. Life, Quito, Ecuador) + 100 mg de progesterona (Gestavec 25, Lab. Vecol, Colombia)
17-12-20	18:00	40 mg de FSH (Folltropin-V, Lab. Vetoquinol, Francia)
18-12-20	6:00	40 mg de FSH
	18:00	30 mg de FSH
19-12-20	6:00	30 mg de FSH
	18:00	20 mg de FSH
20-12-20	6:00	20 mg de FSH + 25 mg de PGF2 $\alpha$ (Lutalyse; Zoetis AR; Argentina; 5 mg/mL)
	18:00	10 mg de FSH + 25 mg de PGF2 $\alpha$ (Lutalyse)
21-12-20	6:00	10 mg de FSH + retiro del implante
	Noche	Detección y registro de la hora del celo
22-12-20		IA con semen sexado a las 12 horas posteriores a la detección del celo + 0.25 mg de GnRH (Fertagyl; MSD Salud Animal; Ecuador; 0.1 mg/mL de Gonadorelina). Segunda IA a las 10 horas más tarde
29-12-20	6:00	Lavado uterino para recuperación de embriones. Evaluación y selección de blastocistos para transferencia

### 7.4 Colecta de embriones *in vivo*

Los embriones se colectaron en el día 7 luego de la IA. Las vacas donadoras se inmovilizaron en un brete, se les aplicó una dosis de Lidocaina al 2%, se removió la

ampolla rectal de materia fecal, se lavó la zona vulvar y perineal, y se palparon los ovarios por vía transrectal para cuantificar el número de cuerpos lúteos. Luego se introdujo en el útero un catéter tipo Foley de dos vías por vía transcervical, con un balón de 30 cc (Agtech, USA), cuyo extremo se fijó 3 a 5 cm delante de la bifurcación de los cuernos uterinos. Inmediatamente se realizó la recuperación de embriones mediante el método no quirúrgico basado en un circuito cerrado con flujo discontinuo (50). La sonda estaba conectada a un filtro de colección donde los embriones fueron retenidos. Se lavaron los filtros con medio de mantenimiento y se depositó el contenido en placas de búsqueda, para la identificación y selección de embriones, que se basó en las recomendaciones de la IETS. Los embriones fueron envasados en pajillas de IA de 0.25 ml para ser transferidos a vacas receptoras.

### **7.5 Aspiración de ovocitos**

Para este procedimiento se practicó OPU, que se realizó en un brete, luego que las vacas donadoras fueron inyectadas con una dosis de anestésico epidural (clorhidrato de lidocaína al 2%; Lavetec Cia. Ltda., Ecuador). Fueron removidas las heces de la ampolla rectal, y el área vulvar lavada con agua limpia. El procedimiento de OPU se realizó con un ecógrafo portátil (Mindray DP-20, China) provisto de un transductor convexo de 5 MHz. Además del transductor, la guía de aspiración contenía una aguja de 18G x 75 mm que estaba conectada a un tubo plástica de 1 mm de diámetro y 2 m de longitud, y a una bomba de vacío (WTA BV 003D ®, Cravinhos, Brasil) regulada a 90 mmHg. A través de esta tubería el líquido folicular era conducido a un tubo cónico estéril de 50 mL con una solución buffer fosfato salino (PBS, Sigma, P-4417) atemperada a 38.5 °C, y suplementada con 1% de suero fetal bovino y 10 UI/ml de heparina.

Una vez culminada la OPU de cada vaca, el tubo con el líquido folicular fue llevado a un ambiente cerrado y limpio, donde el contenido fue filtrado y lavado con PBS, y luego vertido en cajas de Petri plásticas de 100 mm para la búsqueda e identificación de los COCs bajo un microscopio estereoscopio (Olympus, SZX10, Tokio, Japón). Una vez lavados tres veces en medio de maduración suplementado con Hepes, una sustancia que mantiene el pH en un rango de 7.2 y 7.6, los COCs de cada vaca fueron puestos en un tubo de vidrio con medio de maduración (+ Hepes) dentro de un transportador de gametos y embriones (WTA ®, Cravinhos, Brasil) a una temperatura de 38.5 °C hasta llegar al

laboratorio FIV. Previamente, los COCs fueron evaluados con un estereoscopio y seleccionados para la maduración aquellos con 2 o más capas compactas de células del cúmulo, citoplasma homogéneo y zona pelucida intacta.

### **7.6 Producción *in vitro* de embriones**

Una vez en el laboratorio, los COCs completaron el periodo de maduración de 24 horas en el interior de una incubadora de CO<sub>2</sub> (Memmert, ICOMed 50; Alemania). Los COCs madurados *in vitro* fueron lavados en medio de fecundación tres veces y transferidos a microgotas de medio de fecundación de 50 µL, que posteriormente fueron inseminadas con semen sexado de toros Charoles.

Los espermatozoides móviles se seleccionaron mediante centrifugación (10 min a 600 g) de semen descongelado en un gradiente de densidad discontinua de Percoll (200 µl de Percoll al 90 y 45% en un microtubo de 1,5 ml). El sedimento se reconstituyó en 1 ml de medio de FIV sin heparina y se centrifugó a 200 g durante 10 min. Posteriormente, el sedimento se diluyó con medio de FIV y se añadió una alícuota de espermatozoides a las microgotas de fertilización (concentración final de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/ml). La incubación (Memmert, ICOMed 50; Alemania) de gametos se realizó durante 18-20 h a 38,5 °C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5%.

Después de la FIV, los supuestos cigotos se separaron de las células del cúmulo pipeteando suavemente, se lavaron tres veces y se transfirieron a microgotas de medio CIV, donde se incubaron durante 6 días a 38,5 °C en una atmósfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub>. En el día 7 luego de haberse iniciado la FIV, día 6 del cultivo, los embriones fueron evaluados en el estereoscopio y los de calidad 1 envasados en pajillas de IA de 0.25 mL para ser transferidos en fresco a vacas receptoras pocas horas después.

### **7.7 Vacas receptoras**

Se prepararon 30 vacas mestizas (*Bos taurus* × *Bos indicus*) primíparas, clínicamente sanas, con una condición corporal  $\geq 3$  en la escala del 1 al 5, cíclicas y con historial reproductivo bueno, sin antecedentes de abortos, parto distócico o metritis.

Al igual que las vacas donadoras, las hembras receptoras se alimentaron a base de pasto gramalote en los potreros, y previo al inicio del programa de transferencia, fueron inyectadas con Ivermec-JB, Catosal B12 y Energimax, en volúmenes acordes a su peso. Asimismo, estas vacas estaban bajo un programa sanitario preventivo similar al descrito para las vacas donadoras.

### 7.8 Sincronización de receptoras

La necesidad de que estas hembras estén en el mismo día del ciclo estral que las vacas donadoras hace necesario que sean sometidas a un protocolo de sincronización del celo y la ovulación. Esto garantiza que haya sincronía entre el ambiente uterino de la receptora y el desarrollo del embrión, y con ello, las probabilidades de consecución de una gestación exitosa se incrementan considerablemente. En la Tabla 3 se describe el tratamiento hormonal aplicado a estas hembras.

Tabla 3. Protocolo de sincronización de la ovulación en vacas receptoras de embriones *in vivo* e *in vitro* en la finca los Leones

Fechas	Hora	Procedimiento
11-12-20	6:00	Inserción del dispositivo intravaginal (CIDR; Zoetis AR; Argentina; 1.38 gr de P4) + 5 mg de benzoato de estradiol (Grafoléon NF; Lab. Life, Quito, Ecuador) + 100 mg de progesterona (Gestavec 25, Lab. Vecol, Colombia)
20-12-20	6:00	Retiro del dispositivo intravaginal + 25 mg de PGF2 $\alpha$ (Lutalyse; Zoetis AR; Argentina; 5 mg/mL) + 400 UI de eCG (Novormon, Zoetis AR; Argentina; 200 UI/mL)
22-12-20	6:00	Detección de celo + 0.25 mg de GnRH (Fertagyl; MSD Salud Animal; Ecuador; 0.1 mg/mL de Gonadorelina)
29-12-20	6:00	Transferencia de embriones + 0.25 mg de GnRH (Fertagyl)

### 7.9 Transferencia de embriones

Para llevar a cabo este procedimiento las vacas receptoras fueron inmovilizadas en un brete y se les inyectó una dosis de anestésico epidural (clorhidrato de lidocaína al 2%; Lavetec Cia. Ltda., Ecuador) para bloquear las contracciones del recto y facilitar el procedimiento. Inmediatamente, se lavó la zona vulvar y perineal con agua limpia y se secó con una toalla de papel. Por vía transrectal se verificó la presencia de al menos un cuerpo lúteo en los ovarios, y se registró el lado en que estaba ubicado. Como estas vacas se encontraban en el día 7 del ciclo estral, el cuello estaba cerrado, por lo cual un

veterinario de gran experiencia se encargó de depositar cada embrión en el extremo anterior del cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo, mediante la técnica de IA. El diagnóstico de gestación se realizó a los 40 días luego de la transferencia, por un veterinario experimentado.

#### **7.10 Análisis estadístico**

Los datos se analizaron con el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System V 9.3; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA), utilizando procedimientos estadísticos descriptivos como promedio y desviación estándar.

## 8 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La Tabla 4 muestra los resultados del procedimiento MOET llevado a cabo en la finca los Leones en vacas de raza Charoles. Se aprecia que hubo una variación considerable entre vacas, corroborándose lo que ha sido anteriormente reportado (50). La vaca 3 produjo 4,5 y 2,25 más ovocitos que las vacas 1 y 2 respectivamente. El promedio de embriones producidos por vaca donadora fue de  $10 \pm 7.2$ . En vacas de leche (Holstein, Pardo Suizo y Jersey) el número de embriones producidos con dos protocolos de superovulación a base de Folltropin y Pluset fue 8.5 y 6.5 respectivamente (51). En otro estudio (15), también se aplicaron dos protocolos de superovulación en vacas Holstein, uno que implicó la sincronización de la ovulación, y otro que se inició luego de la detección del celo. Con el primer protocolo se produjeron aproximadamente 2 embriones más que con el segundo ( $8.7 \pm 1.8$  y  $6.5 \pm 2.0$  respectivamente) (15). En los dos estudios anteriores en vacas lecheras se produjeron menos embriones que en el estudio presente, probablemente de debido a que superovularon vacas de grupos raciales diferentes.

Tabla 4. Número de embriones in vivo obtenidos por vaca donadora y numero de preñeces en vacas receptoras en la finca los Leones

Donadora	Nro. de embriones grado 1	Nro. de preñeces
Vaca 1	4	2
Vaca 2	8	5
Vaca 3	18	9
TOTAL	30	16

El promedio general de preñez fue  $53,1 \pm 7,2\%$ , es decir, se preñaron 16 de 30 vacas receptoras. De los embriones de calidad 1 producidos por la vaca donadora 2, el 62,5% de ellos iniciaron una gestación exitosa, mientras que en las vacas 1 y 3, solo el 50% de ellos lo hicieron (Figura 14).

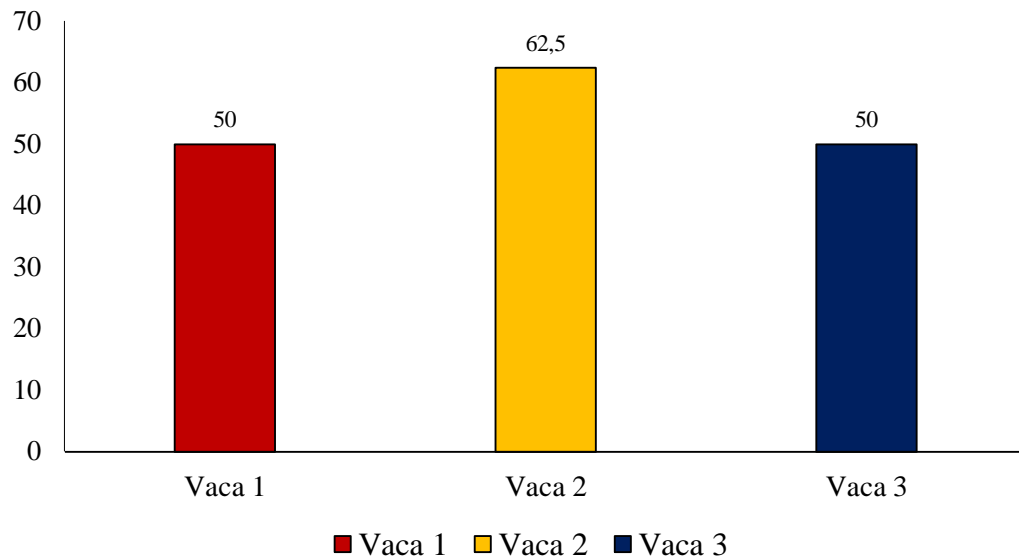


Figura 14. Tasa de preñez en vacas receptoras de embriones in vivo en la finca los Leones

En un estudio en Boyacá, Colombia, la tasa de preñez general en tres grupos genéticos fue de 55,1% (51), comparable a la lograda en la presente investigación. La tasa de preñez en cada raza fue 63.3% para las vacas Normando, 55.5% para las Holstein y 44.2% para las Brangus (52).

En dos razas de carne, Angus y Brahman, que fueron sometidas a un protocolo de sincronización de la ovulación con celo detectado, la tasa de preñez fue de 49 y 54% respectivamente (53). Los autores observaron que las receptoras de menor edad (4 años) se preñaron proporcionalmente menos que las de 5 y 6 años (53). Los resultados de preñez indicados en los dos estudios citados previamente (52, 53) son comparables a los obtenidos en la presente investigación.

De las tres vacas Charoles aspiradas, se obtuvo un total de 25 ovocitos, lo que hace un promedio de  $8,3 \pm 2,1$  ovocitos por vaca. Una vez que estos ovocitos fueron madurados, fecundados y los presuntos cigotos cultivados in vitro, se produjo un total de 10 embriones grado 1, y el promedio por vaca fue  $3,3 \pm 0,6$ . La proporción de embriones en relación a los ovocitos colectados fue de 50, 44,4 y 30% para las vacas 1, 2 y 3 respectivamente.

Tabla 5. Número de ovocitos colectados y de embriones obtenidos in vitro por vaca donadora, y número de preñeces en vacas receptoras en la finca los Leones



Donadora	Nro. ovocitos	Nro. de embriones	Nro. de preñeces
Vaca 1	6	3	0
Vaca 2	9	4	1
Vaca 3	10	3	1
Total	25	10	2

De los embriones producidos *in vitro* y transferidos a vacas receptoras, solo 2 de 10 ( $20 \pm 17,3\%$ ) lograron iniciar la gestación (Gráfico 15). Mientras que de la vaca donadora 1 no se produjo ninguna preñez, de las vacas 2 y 3 solo se produjo solo una.

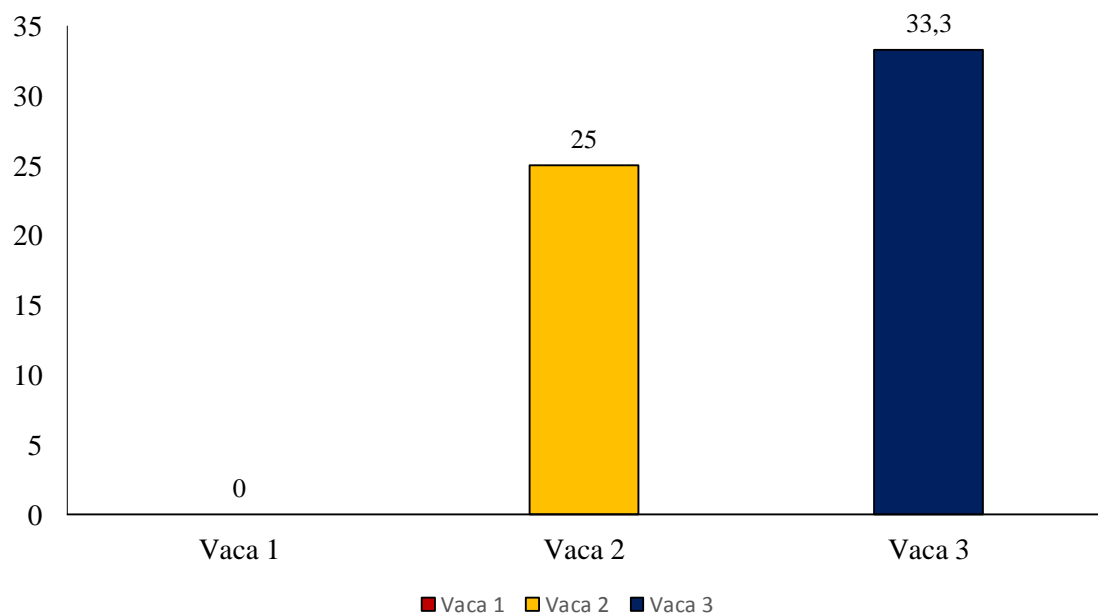


Figura 15. Tasa de preñez en vacas receptoras de embriones *in vitro* en la finca los Leones

Las Tabla 6 muestra el valor económico de cada embrión y preñez cuando se aplica un programa MOET. Se indica el costo de cada producto utilizado por vaca y el costo total del tratamiento superovulatorio, incluyendo el valor económico de las transferencias a las vacas receptoras. Se aprecia que el costo por embrión transferible fue estimado en 104,4 US\$, mientras que el valor de una preñez fue de 195,7 US\$.

Tabla 6. Precios de productos usados en el tratamiento de superovulación y costo por embrión y por preñez en vacas Charoles de la finca los Leones

Producto	Precio (US\$)	Cantidad usada × vaca	Costo × vaca (US\$)
DIV (10 unidades)	110,0	1 unid.	11,0
Gestavet (25 mg/ml; 10 ml)	10,0	4 ml	4,0
Grafoleon (25 mg/ml; 20 ml)	10,0	1 ml	1,0
Folltropin (400 mg; 20 ml)	250,0	200 mg	125,0
Fertagyl (0,1 mg/ml; 5 ml)	15,0	0.25 mg	7,5
Tubo Y (lavado uterino)	21,0	1 unid.	21,0
Sonda Foley (lavado uterino)	24,0	1 unid.	24,0
Filtro de embriones (unidad)	31,0	1 unid.	31,0
Caja búsqueda (10 unidades)	21,0	1 unid.	2,1
Dosis de semen (cada una)	30,0	2 unid.	60,0
Lavado uterino × vaca	250,0	1 unid.	250,0
Costo del tratamiento superovulatorio × vaca (US\$)			544,1
Costo total del tratamiento superovulatorio (US\$)			1.632,3
Nro. de embriones transferibles producidos			30
Costo total de transferencias a razón de 50,0 US\$ × vaca (US\$)			1500,0
Nro. de preñeces logradas			16
Costo total del programa de superovulación + transferencias (US\$)			<b>3.132,3</b>
Costo × embrión transferible (US\$)			<b>104,4</b>
Costo × preñez (US\$)			<b>195,7</b>

La Tabla 7 muestra una estimación del valor económico de un embrión y de cada preñez cuando se aplica un programa PIVE. En este caso, el costo del embrión fue provisto por el laboratorio comercial de FIV que indico un valor de 100 US\$, ligeramente inferior al valor económico del embrión producido por MOET.

Tabla 7. Costo por embrión producido in vitro y costo por preñez en vacas Charoles de la finca los Leones

El valor de cada embrión transferible producido <i>in vitro</i> incluye el traslado ida y vuelta al laboratorio, aspiración de ovocitos en la finca, materiales usados en la aspiración folicular, costo de producción de embriones <i>in vitro</i> en el laboratorio y transferencia	
Nro. de embriones transferibles producidos in vitro	10
Nro. de preñeces logradas	2
Costo × embrión <i>in vitro</i> (US\$)	<b>100,0</b>
Valor total de embriones producidos <i>in vitro</i> (US\$)	1000,0
Costo × preñez (US\$)	<b>500,0</b>

Cada embrión MOET tuvo un valor de 104.4 dólares y la preñez de 195.7 dólares. Aunque el valor económico del embrión fue ligeramente menor en PIVE que en MOET, cada preñez obtenida con embriones in vivo fue 2.5 veces menor que la obtenida con embriones in vitro. Esto se debió principalmente a que solo 20% de las transferencias de embriones PIVE fueron exitosas, mientras que 53,1 lo fueron con MOET. Se puede esperar que con un incremento en la tasa de preñeces con embriones in vitro, el costo por preñez disminuya considerablemente.

En un estudio en Brasil con ganado Wagyu se compararon ambos métodos de producción de embriones y determinó que, de acuerdo a los embriones producidos por cada biotécnica, el costo de cada embrión PIVE fue 1.9 mayor que el MOET (54), concordando con los resultados de la presente investigación.

Aunque parece ser costoso aplicar estas biotecnologías reproductivas, hay que tener en cuenta que el beneficio que estas producen en las fincas es doble. En primer lugar, si se hace una buena selección de las vacas donadoras el impacto del uso de estas biotécnicas en la calidad genética del rebaño es muy grande; en segundo lugar, se mejora la eficiencia reproductiva del rebaño y se reduce el intervalo entre generaciones. Esto trae como consecuencia una mejor respuesta a los esfuerzos de selección genética (54).

En esta investigación se demostró que el método MOET fue más efectivo en términos de embriones producidos y preñeces logradas. No obstante, la PIVE ha demostrado ser una biotecnología muy efectiva, a tal punto que en los últimos años la producción de embriones in vitro ha duplicado a los producidos mediante MOET (55).

## 9 CONCLUSIONES

- El porcentaje de preñez de las vacas receptoras fue mayor (53%) cuando fueron transferidos embriones *in vivo* que cuando se transfirieron embriones *in vitro* (20%).
- Del total de ovocitos colectados de las vacas donadoras, 40% se convirtieron en embriones trasferibles.
- El costo de cada embrión fue ligeramente inferior en los producidos *in vitro* que los *in vivo*, y el valor económico de cada preñez fue 2.5 veces menor cuando se transfirieron embriones *in vivo* que *in vitro*.

## 10 RECOMENDACIONES

- Divulgar los resultados obtenidos en la presente investigación a los ganaderos de Macas, para que sirva de referencia para la implementación de esta biotecnología en las fincas de la región.
- Aplicar protocolo de superovulación para transferencia de embriones producidos *in vivo* en vaconas y vacas receptoras para obtener numerosas crías de las vacas con mayor mérito genético de las fincas
- Se recomienda continuar con las investigaciones en la transferencia de embriones *in vitro* con la finalidad de mejorar y validar esta biotecnología en ganado Charoles, y hacer disponible a los ganaderos de esta provincia y del país.

## 11 BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández-Baca S. Desafíos de la producción bovina de doble propósito en América Tropical. En Madrid Buri N. y Soto Beloso E, editores. Manejo de la ganadería doble propósito. Maracaibo: Ediciones Astro Data; 1995. p. 1-19.
2. Urdaneta F. Mejoramiento de la eficiencia productiva de los sistemas de ganadería bovina de doble propósito (*Taurus-Indicus*). Arch. Latinoam. Prod. Anim. 2009; 17(3):109-120.
3. Urrego R, Restrepo G. Implicaciones de la biotecnología reproductiva en la producción animal Rev. CES Med. Vet. y Zoot. 2006;1(2): 64-78
4. Palma G. Biotecnología de la reproducción. En: Palma G, editor. Biotecnología de la Reproducción. Buenos Aires: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. 2001. p. 1-19.
5. González R. Procedimientos en los programas de trasplante de embriones en ganado bovina. En: González-Stagnaro C, editor. Reproducción Bovina. Maracaibo: ediciones Astro Data; 2001 p. 389-410.
6. Bó GA, Baruselli PS, Chesta PM, Martins CM. (2006). The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. Theriogenology. 2006;65(1):89-101.
7. Bó GA, Mapletoft RJ. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. Theriogenology. 2014;81:38-48.
8. Tríbulo A, Rogan D, Tribulo H, Tribulo R, Alasino RV, Beltramo D, Bianco I, Mapletoft RJ, Bó GA. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. Anim. Reprod. Sci. 2011;129(1-2):7-13.
9. Sakaguchi K, Ideta A, Yanagawa Y, Nagano M, Katagiri S, Konishi M. Effect of a single epidural administration of follicle-stimulating hormone via caudal vertebrae on superstimulation for in vivo and in vitro embryo production in Japanese black cows. J. Reprod. Develop. 2018;64(5):451-455.
10. Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA, Taverne MA. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology. 1988; 30:751-762.
11. Watanabe YF, de Souza AH, Mingoti RD, Ferreira RM, Batista EOS, Dayan A, Watanabe O, Meirelles FV, Nogueira MFG, Ferraz JBS, Baruselli PS. Number of

- oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. *Anim. Reprod.* 2017; 14:635-644.
12. Sanches BV, Zangirolamo AF, Seneda MM. Intensive use of IVF in large-scale dairy programs. *Anim. Reprod.* 2019;16(3):394-401.
  13. International Embryo Technology Society (IETS). *Embryo Technol. Newsl.* 2018;36(4):46.
  14. Arévalo C. Evaluación a nivel de ganado tipo carne (Charolais) y de ganado tipo leche (Brown Swiss) de dos protocolos de superovulación en la producción de embriones en la región amazónica sur del Ecuador [tesis de maestría]. Universidad Nacional de Loja; 2014 [citado 05 de abril de 2021]. Recuperado de: <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/11897>.
  15. Soria M, Soria, C, Argudo, D, Serpa G, Méndez MS, Torres C, Guevara G. Superovulación con sincronización de la onda folicular y con celo natural en vacas Holstein. *Rev. Prod. Anim.* 2017;29(1):40-43.
  16. Senger P. *Pathways to pregnancy and parturition.* Redmond USA: Current Conceptions, Inc. 3th ed.; 2015.
  17. Hafez ESE, Hafez, B. *Reproduction in Farm Animals.* Baltimore USA: Wiley-Blackwell; 2013.
  18. Carriere PD, Gnemmi G, DesCoteaux L, Matsui M, Miyamoto A, Colloton J. Bovine ovary. In: DesCoteaux L, Colloton J., Gnemmi G., editors. *Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography.* Iowa, USA:Wiley-Blackwell; 2010. P. 35-59.
  19. Perea, F., Cruz, R. Usos de la ultrasonografía en la evaluación reproductiva de la vaca. En: González-Stagnaro C, editor. *Reproducción Bovina.* Maracaibo: Ediciones Astro Data; 2001. P. 358-372.
  20. Smith C. Applications of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology* 1988; 29:203-212.
  21. Gordon I. In vitro fertilization. In Gordon I, editor. *Laboratory production of cattle embryos.* Oxon, UK: CABI Publishing; 2003. pp. 176-219.
  22. Ruiz S. Ovum Pick Up (OPU) en bovinos: Aplicaciones en Biotecnología de la reproducción. *Cría y Salud* 2010;6(31):58-63.

23. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 2006; 7;65(1):236-44.
24. Leibo SP, Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology* 2002;57(1):303-26.
25. Hasler JF. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology* 2014;81(1):152-69.
26. Mapletoft RJ. History and perspectives on bovine embryo transfer. *Anim. Reprod.* 2013;10(3):168-173.
27. Cabodevilla J, Torquati S. Superovulación de hembras bovinas. En: *Biología de la Reproducción*. Palma G (Ed). Buenos Aires: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2001; Cap. 6:79-108.
28. Phillippo M, Rowson LEA. Prostaglandins and superovulation in the bovine. *Ann Biol Anim Biochim Biophys*; 1975;15:233-240.
29. Monniaux D, Chupin D, Saumande J. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 1983;19:55-82.
30. Looney C, Boutle B, Archibald L, Godke R. Comparison of once daily FSH and twice-daily FSH injections for superovulation in beef cattle. *Theriogenology* 1981;15:13-22.
31. Mikkola, M., Taponen, J. Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Follitropin or Pluset. *Theriogenology* 2017;88:84-88.
32. Barros CM, Nogueira MFG. Superovulation in zebu cattle: protocol P-36. *Embryo Technol. Newsl.* 2005;23:5-9.
33. Bols P. Punción folicular (Ovum pick-up, OPU) en la vaca. En: Palma G, editor. *Biología de la Reproducción*. Buenos Aires: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. 2001. p. 185-224.
34. Hernández, H. Fertilización in vitro. En: González-Stagnaro C, editor. *Reproducción Bovina*. Maracaibo: Ediciones Astro Data; 2001. Cap. 26, 411-426.
35. Ruiz S; Astiz S. Producción in vitro de embriones (PIV) en biología de la reproducción bovina. *ANEMBE* 2010;ba88: 25-32.

36. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997;47(1):23-32.
37. Palma G. Producción in vitro de embriones. En: Palma G, editor. Buenos Aires: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; 2001. p. 225-294.
38. Graf A, Krebs S, Heininen-Brown M, Zakhartchenko V, Blum H. Genome activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Anim. Reprod. Sci.* 2014;149:46-58.
39. Hyttel P, Sinowatz F, Vejlsted M. *Domestic Animal Embryology*. London: Elsevier; 2010. P. 68-78.
40. Lonergan P, Fair T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* 2007;69(1):17-22.
41. Wright JM. Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 4th Edition. Appendix D; (2009). pp 141-144.
42. Albeiro R. Manejo de donantes y receptoras. En: Palma G, editor. *Biología de la Reproducción*. Buenos Aires: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; 2001. Cap. 2, pp. 21-26.
43. Ponsart C, Le Bourhis D, Knijn H, Fritz S, Guyader-Joly C, Otter T, Lacaze S, Charreaux F, Schibler L, Dupassieux D, Mullaart E. Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. *Reprod Fertil Dev.* 2013;26(1):12-21.
44. Durán F. *Inseminación y Transferencia de Embriones en Animales de Granja*. Bogotá: Grupo Latino Editores; 2009. 522 pp.
45. Oyuela LA, Jiménez C. Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 2010;57:191-200.
46. Chebel RC, Demétrio DG, Metzger J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology* 2008;69(1):98-106.
47. Fernández A. Estatus fisiológico de la hembra bovina y su relación con la producción in vitro de embriones. En: Hernández H; Villamediana P, editores. *Fisiología y Biología del Embrión*. Cuaderno Científico Girar 12. Maracaibo: Ediciones Astro Data; 2012. pp. 113-121.



48. Gutiérrez, JC, Pirela A. Evaluación de embriones bovinos. En: Hernández H; Villamediana P, editores. *Fisiología y Biotecnología del Embrión*. Cuaderno Científico Girarz 12. Maracaibo: Ediciones Astro Data; 2012. pp. 93-104.
49. Google Maps Localización de la Finca los Leones. Parroquia San Isidro, Cantón Macas, Provincia Morona Santiago, Ecuador. Recuperado el 08 de agosto de 2021. (<https://www.google.com.ec/maps/place/San+Isidro/@-2.1427351,-78.1605152,2842m/data>).
50. Phillip PE, Jahnke MM. Embryo Transfer (Techniques, Donors, and Recipients). *Vet Clin Food Anim*. 2016;32(2):365-385.
51. Betancourth JF, Cáceres G. Superovulación y transferencia de embriones en vacas lecheras utilizando dos protocolos hormonales [Tesis de Licenciatura]. Zamorao, Honduras; 2014. [citado 20 de Mayo de 2021]. Recuperado a partir de: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/82/1/T3185.pdf>
52. Farjan-Rojas OO, Porras Vargas JL. Evaluación de la tasa de concepción de tres razas bovinas receptoras de embriones en el trópico alto. *Cienc. Agricult*. 2014;11(1):77-83.
53. Chase JR, Chad C. Transferencia de embriones en vacas receptoras Angus y Brahman: Efecto de dos métodos de sincronización de celos sobre el celo inducido y preñez. *Rev. Cient*. 2009;19(6):630-638.
54. Facioli FL, De Marchi F, Marques MG, Michelin PRP, Zanella EL, Caires KC, JJ, Zanella R. The outcome and economic viability of embryo production using IVF and SOV techniques in the Wagyu breed of cattle. *Vet. Sci*. 2020;7:58.
55. Nguyen. The economic value of assisted reproductive biotechnology to ruminant industries. Vietnam Academy of Science and Technology. 2015. [citado 20 de Mayo de 2021]. Recuperado a partir de: [https://www.fftc.org.tw/htmlarea\\_file/activities/20150728110829/\(7\)%20Nguyen%20%20Bui%20FFTC2015-BuiXN-fullpaper-0607%202015.pdf](https://www.fftc.org.tw/htmlarea_file/activities/20150728110829/(7)%20Nguyen%20%20Bui%20FFTC2015-BuiXN-fullpaper-0607%202015.pdf).
56. International Embryo Technology Society (IETS). 2018. Embryo Technology Newsletter, 36(4):46. [citado 20 de Mayo de 2021]. Recuperado a partir de: [https://www.iets.org/pdf/Newsletter/Dec18\\_IETS\\_Newsletter.pdf](https://www.iets.org/pdf/Newsletter/Dec18_IETS_Newsletter.pdf).

## 12. ANEXOS

### ANEXO 1: AVAL DE TRADUCCIÓN



### AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal CERTIFICO que:

La traducción del resumen al idioma Inglés del proyecto de investigación cuyo título versa: **“PREÑEZ DE VACAS MESTIZAS CON LA IMPLANTACIÓN DE EMBRIONES IN VIVO E IN VITRO, PARA MEJORAR LA GENÉTICA BOVINA EN MACAS”** presentado por: **NINA MÓNICA PILLA CAIZABANDA**, egresada de la Carrera de: **MEDICINA VETERINARIA**, perteneciente a la **FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**, lo realizó bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo a la peticionaria hacer uso del presente aval para los fines académicos legales.

Latacunga, Agosto del 2021

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'B. Cevallos G.', is written over a horizontal line.

**Bolívar Maximiliano Cevallos Galarza.**  
**DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS-UTC**  
**CI: 0910821669**



## ANEXO 2: HOJA DE VIDA DEL TUTOR



## UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

**DATOS INFORMATIVOS PERSONAL DOCENTE****DATOS PERSONALES**

**APELLIDOS:** GARZON JARRIN  
**NOMBRES:** RAFAEL ALFONSO  
**ESTADO CIVIL:** CASADO  
**CEDULA DE CIUDADANIA:** 0501097224  
**DIRECCION DOMICILIARIA:** SALCEDO: CONJUNTO HABITACIONAL SIE  
**TELEFONO CONVENCIONAL:** 032727575 **TELEFONO CELULAR:** 0999934497  
**CORREO ELECTRONICO:** Rafael.garzon@utc.edu.ec; garzonjarrin@gmail.com  
**EN CASO DE EMERGENCIA CONTACTARSE CON:** Loudes Zambonino Tlf 0987034912

**ESTUDIOS REALIZADOS Y TITULOS OBTENIDOS**

NIVEL	TITULO OBTENIDO	FECHA DE REGISTRO EN EL CONESUP	CODIGO DEL REGISTRO CONESUP
TERCER	Dr. Medicina Veterinaria y Zootecnia	1005-04-492026	29- 03- 2004
CUARTO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MAGISTER EN ciencias de la educación:mención planificación y administración edutativaA</li> <li>• DIPLOMADO: en didáctica de la educación superior</li> </ul>	1020-05-587559	11-07-2005
CUARTO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS. PhD</li> </ul>	2018-09-11	1921128557

**HISTORIAL PROFESIONAL**

**UNIDAD ACADEMICA EN LA QUE LABORA:** C.A.R.E.N.  
**CARRERA A LA QUE PERTENECE:** Medicina Veterinaria  
**AREA DEL CONOCIMIENTO EN LA CUAL SE DESEMPEÑA:** Cc.  
 Humanísticas\_Agricultura y veterinaria  
**PERIODO ACADEMICO DE INGRESO A LA UTC:** Octubre 1997  
**TRABAJO ACTUAL .** UTC

-----

**ANEXO 3: HOJA DE VIDA DEL ESTUDIANTE****CURRICULUM VITAE**

---

**INFORMACIÓN PERSONAL**

APELLIDO: Pilla Caizabanda

NOMBRE: Nina Mónica

N. DE CEDULA: 1804849667

EDAD: 30 Años

ESTADO CIVIL: Divorciada

NACIONALIDAD: Ecuatoriana

TELÉFONOS: 0982860271

DOMICILIO: Ramos Loma –Salasaca

EMAIL: monicamsqz@gmail.com

**ESTUDIOS**

---

**PRIMARIA**

Unidad Educativa Manzanapamba

**SECUNDARIA**

Instituto Tecnológico Agropecuario Benjamín Araujo

**SUPERIOR**

Instituto Tecnológico Bolívar

## ANEXOS 4. FIGURAS DETALLAS.

**Figura 1:** Vaca donadora Ungí.

**Fuente:** Directa  
**Elaborado por:** PILLA, Nina,2021.

**Figura 3:** Vaca donadora Cachitos.

**Fuente:** Directa  
**Elaborado por:** PILLA, Nina,2021.

**Figura 2:** Vaca donadora Bucana.

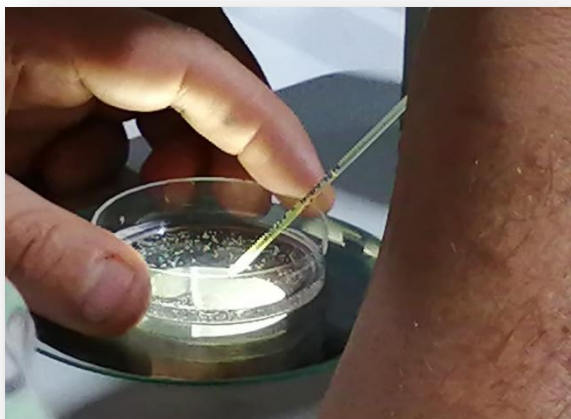
**Fuente:** Directa  
**Elaborado por:** PILLA, Nina,2021.

**Figura 6:** Lavado de embriones.

**Fuente:** Directa  
**Elaborado por:** PILLA, Nina,2021.



**Figura 7:** Selección de embriones.



**Fuente:** Directa  
**Elaborado por:** PILLA, Nina, 2021.

**Figura 8:** Los embriones in vivo.



**Fuente:** Directa  
**Elaborado por:** PILLA, Nina, 2021.

**Figura 9:** Transferencia de embriones.



**Fuente:** Directa  
**Elaborado por:** PILLA, Nina, 2021.

**Figura 10:** Chequeo ginecológico a las vacas receptoras.



**Fuente:** Directa  
**Elaborado por:** PILLA, Nina, 2021.