



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

DIRECCION DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

“Impacto de la clonación de embriones en los parámetros genómicos reproductivos en bovinos de carne (*Bos taurus*) mantenidos en ambiente tropical”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Magister en Ciencias Veterinarias

Autora:

Constante Mosquera María Fernanda

Tutor:

Gutiérrez Reinoso Miguel Ángel, PhD.

Co-tutor:

García Herreros Manuel, PhD.

LATACUNGA-ECUADOR

2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación **“Impacto de la clonación de embriones en los parámetros genómicos reproductivos en bovinos de carne (*Bos taurus*) mantenidos en ambiente tropical”**

Presentado Constante Mosquera María Fernanda, para optar por el título Magíster en Ciencias Veterinarias.

CERTIFICO

Que dicho Trabajo de Titulación ha sido revisado en todas sus partes y se considera que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación para la valoración por parte del Tribunal de Lectores que se designe y su exposición y defensa pública.

Latacunga, 08, abril, 2025



.....
PhD.**Dr. Gutiérrez Reinoso Miguel Ángel**

C.I:050223662-3

APROBACIÓN TRIBUNAL

El Trabajo de Titulación: **“Impacto de la clonación de embriones en los parámetros genómicos reproductivos en bovinos de carne (Bos taurus) mantenidos en ambiente tropical”** ha sido revisado, aprobado y autorizada su impresión y empastado, previo a la obtención del título de Magíster en Ciencias Veterinarias. El trabajo reúne los requisitos de fondo y forma para que el estudiante pueda presentarse a la exposición y defensa.

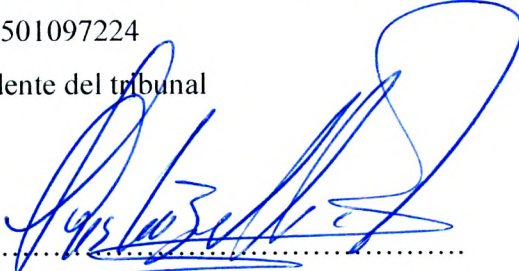
Latacunga, 05, Mayo, 2025



.....
PhD. Garzón Jarrin Rafael Alfonso

CC: 0501097224

Presidente del tribunal



.....
MSc. Beltrán Romero Cristian Fernando

CC: 0501942940

Lector 2



.....
MSc. Quishpe Mendoza Xavier Cristóbal

CC: 0501880132

Lector 3

DEDICATORIA

En primer lugar, agradezco a Dios por darme un día más de vida, dedico todos mis triunfos como mis derrotas que me han permitido adquirir nuevos conocimientos en la vida diaria dedico con mucho amor y cariño a mis padres Manuel, Clara por ser la motivación diaria de mi subsistir por enseñarme a perseguir mis sueños, a mi prima Alexandra y demás familiares por el apoyo constante e incondicional

María Fernanda Constante

AGRADECIMIENTO

Una vez culminado este trabajo de titulación, elevo mi agradecimiento a Dios y a la Santísima Virgen María por concederme la sabiduría, fortaleza y perseverancia necesarias para alcanzar esta importante meta académica: la obtención del grado de Doctora en Ciencias Veterinarias. Su guía espiritual ha sido mi sostén a lo largo de este proceso de formación científica.

Expreso mi más profundo agradecimiento a la Corporación Ecuatoriana para el Desarrollo de la Investigación y la Academia (CEDIA) por el financiamiento otorgado a través de su programa de fomento a la investigación, el cual hizo posible la ejecución del presente proyecto I+D+I-XVIII-2023-09-Clonación bovina. Así como a las instituciones que formaron parte: Universidad San Francisco de Quito, Universidad Nacional de Loja, gracias por el valioso apoyo institucional, y a la Universidad Técnica de Cotopaxi, mi casa de estudios y de formación profesional.

Mi más sincero reconocimiento al Dr. Miguel Á. Gutiérrez R., Dr. Manuel García H. y Dr. Eduardo H. Escribano V. por sus valiosos aportes para la realización de este trabajo de tesis.

Finalmente, gracias a mi querida Universidad Técnica de Cotopaxi por brindarme la oportunidad de crecer como investigadora y formar parte de su comunidad. Este logro es también un testimonio del compromiso institucional con la excelencia académica-científica y el desarrollo agropecuario del país.

A todos ustedes, mi más profundo agradecimiento.

María Fernanda Constante

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Quien suscribe, declara que asume la autoría de los contenidos y los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación.

Latacunga, 01, abril, 2025

.....

María Fernanda Constante Mosquera
CC: 1850431493

RENUNCIA DE DERECHOS

Quien suscribe, cede los derechos de autoría intelectual total y/o parcial del presente Trabajo de Titulación a la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Latacunga, 01, abril, 2025



.....
María Fernanda Constante Mosquera

CC: 1850431493

RENUNCIA DE DERECHOS

Quien suscribe, cede los derechos de autoría intelectual total y/o parcial del presente Trabajo de Titulación a la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Latacunga, 01, abril, 2025



.....
María Fernanda Constante Mosquera

CC: 1850431493

AVAL DEL PRESIDENTE

Quien suscribe, declara que el presente Trabajo de Titulación: **“Impacto de la clonación de embriones en los parámetros genómicos reproductivos en bovinos de carne (*Bos taurus*) mantenidos en ambiente tropical”** contiene las correcciones a las observaciones realizadas por los miembros del Tribunal en la predefensa.

Latacunga, 05, Mayo, 2025



.....
PhD. Rafael Alfonso Garzón Jarrin

CC: 0501097224

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
DIRECCION DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

Título: “Impacto de la clonación de embriones en los parámetros genómicos reproductivos en bovinos de carne (*Bos taurus*) mantenidos en ambiente tropical”

Autora: Constante Mosquera María Fernanda

Tutor: DR. Gutiérrez Reinoso Miguel Ángel, PhD.

Co-tutor: DMV.Garcia Herreros Manuel, MSc, PhD.

RESUMEN

La clonación de embriones representa una de las biotecnologías reproductivas más innovadoras aplicadas a la mejora genética en bovinos. El objetivo fue evaluar el impacto de la clonación de embriones en los parámetros genómicos reproductivos en bovinos de carne (*Bos taurus*) mantenidos en ambiente tropical. Se implementó un diseño experimental controlado y longitudinal mediante dos grupos comparativos: 32 embriones bipartidos (clonados) y 22 embriones completos (control) obtenidos mediante técnicas de superovulación y micromanipulación/bipartición. El análisis estadístico se realizó mediante SPSS y R, aplicando modelos de análisis de varianza (ANOVA), regresiones lineales y pruebas de significación. Se emplearon herramientas de genotipificación mediante arrays de alta densidad (Axiom™ 63K y 100K SNPs) y análisis bioinformático para caracterizar la arquitectura genómica de los terneros nacidos. Se evaluaron genes asociados a parámetros reproductivos/productivos: *CAPNI*, *CAST*, *MYO*, *LEP*, *GHI* y *GHR*. Los terneros provenientes de embriones bipartidos y completos mostraron una expresión génica similar en loci críticos vinculados a eficiencia reproductiva, crecimiento muscular y metabolismo. Hubo asociaciones significativas entre polimorfismos específicos y parámetros fenotípicos como tasa de gestación, peso al nacimiento y viabilidad embrionaria. No hubo alteraciones genómicas mayores atribuibles al proceso de bipartición. En conclusión, la clonación de embriones mediante bipartición representa una herramienta eficiente para la replicación de genotipos superiores en ganado de carne sin comprometer la expresión de genes claves asociados a la reproducción/productividad bajo condiciones tropicales.

PALABRAS CLAVE: clonación embrionaria; *Bos Taurus*; SNPs; reproducción bovina; bipartición; genética tropical.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

Title: “Impact of embryo cloning on reproductive genomic parameters in beef cattle (*Bos taurus*) kept in a tropical environment”

Author: Constante Mosquera María Fernanda

Tutor: DR. Gutiérrez Reinoso Miguel Ángel, PhD.

Co-tutor: DMV.Garcia Herreros Manuel, MSc, PhD.

ABSTRACT

Embryo cloning represents one of the most innovative reproductive biotechnologies applied to genetic improvement in cattle. The objective was to evaluate the impact of embryo cloning on reproductive genomic parameters in beef cattle (*Bos taurus*) kept under tropical conditions. A controlled and longitudinal experimental design was implemented using two comparative groups: 32 split embryos (cloned) and 22 complete embryos (control) obtained by superovulation and micromanipulation/splitting. Statistical analysis was performed using SPSS and R, applying analysis of variance models (ANOVA), linear regressions and significance tests. Genotyping tools using high density arrays (Axiom™ 63K and 100K SNPs) and bioinformatics analysis were used to characterize the genomic architecture of the calves born. Genes associated with reproductive/productive parameters were evaluated: *CAPNI*, *CAST*, *MYO*, *LEP*, *GHI* and *GHR*. Calves from split embryos showed comparable gene expression to control individuals at critical loci linked to reproductive efficiency, muscle growth, and metabolism. Significant associations were observed between specific polymorphisms and phenotypic parameters such as gestation rate, birth weight, and embryo viability. There were no major genomic alterations attributable to the bipartitioning process. In conclusion, embryo cloning by splitting represents an efficient tool for the replication of superior genotypes in beef cattle without affecting the key genes associated with reproduction and productivity under tropical conditions.

Keywords: embryo cloning, *Bos taurus*, SNPs, bovine reproduction, splitting.

Olga María de los Ángeles Cárdenas Guanoluisa con cédula de identidad número:1707530141; Magister en: Enseñanza de inglés, con número de registro de la SENESCYT: 1027-11-720602; **CERTIFICO** haber revisado y aprobado la traducción al idioma Inglés del resumen del trabajo de investigación con el título: “**IMPACTO DE LA CLONACIÓN DE EMBRIONES EN LOS PARÁMETROS GENÓMICOS PRODUCTIVOS EN BOVINOS DE CARNE (*BOS TAURUS*) MANTENIDOS EN AMBIENTE TROPICAL**” de: **Constante Mosquera María Fernanda** aspirante a magister en **Ciencias Veterinarias**.

Latacunga, 1 de Abril, 2025



Lcda. Cárdenas Guanoluisa Olga María de los Ángeles, Mgtr.
C.I.: 1707530141

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN:	1
JUSTIFICACIÓN:	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:	4
HIPÓTESIS O PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN:.....	6
OBJETIVOS:	7
CAPÍTULO I. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	8
1.1. HISTORIA Y MÉTODOS DE LA BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA	8
1.2. TECNOLOGÍAS DE EMBRIONES BOVINOS	1
1.3. HISTORIA CLONACIÓN Y DIVISIÓN DE EMBRIONES EN MAMÍFEROS:	1
1.3.1. Clonación:	2
1.3.2. Clonación en animales de granja:	2
1.3.3. Clonación manual:	3
1.3.4. Efectos de los tipos de células donantes en el desarrollo de embriones bovinos mediante tecnología de clonación por inyección de citoplasma:	4
1.3.5. Tecnología de clonación y vitrificación para mejorar el progreso genético del ganado vacuno:.....	4
1.4. BLASTOCIDOS EN LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES:	5
1.5. DIVISION EMBRIONARIA:	6
1.6. MICROARN EMBRIONARIOS ESENCIALES PARA EL DESARROLLO DE EMBRIONES PREVIOS A LA IMPLANTACIÓN BOVINA:	6
1.7. FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN GANADO BOS TAURUS SUPEROVULADO:.....	7
1.8. EMBRIÓN PRODUCIDO IN VITRO EN LA PRODUCCIÓN GANADERA:	8
1.9. ANIMALES TRANSGÉNICOS Y SUS APLICACIONES:.....	9
1.10. REPRODUCCIÓN DE VACAS LECHERAS BAJO LA INFLUENCIA DEL ESTRÉS TÉRMICO:.....	9
1.11. METODOS DE DIAGNOSTICO DE GESTACION:.....	10

1.12. DIVISION DE EMBRIONES:.....	11
1.13. INTERFERÓN (IFN):.....	14
1.14. ANÁLISIS GENÓMICO RASGOS REPRODUCTIVOS EN GANADO BOVINO:	15
1.15. EPIGENÉTICA, EN EMBRIONES TRANSFERIDOS:.....	16
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.1. UBICACIÓN:.....	18
2.1.1. Pluviosidad:	19
2.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN:.....	20
2.3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN:	21
2.4. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN:	22
2.4.1. Técnicas utilizadas.....	23
2.4.1.1. Selección de donantes de embriones	23
2.4.1.2. Selección de receptoras de embriones	24
2.4.1.3. Protocolo de superovulación.....	24
2.4.1.4. Colecta de embriones.....	25
2.4.1.5. Clasificación de embriones:.....	26
2.4.1.6. Método de bipartición de embriones (Splitting Embryo):.....	27
2.4.1.7. Transferencia de embriones:.....	27
2.4.1.8. Diagnóstico de gestación:	28
2.4.1.9. Análisis genómico:	29
2.4.1.10. Extracción de ADN y Tipificación genes de Interés Comercial:	29
2.4.1.11. Análisis bioinformático:	30
2.5. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y PROCESAMIENTO DE DATOS:	33
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	49
CONCLUSIONES:	49
RECOMENDACIONES:	50
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:	51

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES:

Ilustración 1. Anatomía del embrión:.....	11
Ilustración 2. Morula.....	12
Ilustración 3. Bipartición embrionaria.....	12
Ilustración 4. Embrión de grado 1.....	12
Ilustración 5. Embrión degenerado.....	13
Ilustración 6. Grado 1.....	13
Ilustración 7. Embriones viables.....	14
Ilustración 8. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP CAPN1_316 (asociado a la terneza de la carne) entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2)...	38
Ilustración 9. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP CAPN1_530 (implicado en la degradación de miofibrillas) entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2).....	39
Ilustración 10. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP CAST_2870 (relacionado con la inhibición de la proteólisis post-mortem) entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2).....	40
Ilustración 11. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP MYO_C313Y (involucrado en el desarrollo muscular) entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2).....	41
Ilustración 12. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP MYO_E226X (marcador relacionado con la eficiencia muscular) entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2).....	42
Ilustración 13. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP MYO_Q204X entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2).....	43
Ilustración 14. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP LEPTIN_A252T (asociado a regulación energética y marmoleo) entre embriones	

bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2).44

Ilustración 15. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP

LEPTIN_A963 (marcador vinculado a eficiencia alimenticia) entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2).45

Ilustración 16. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP GH1_2291

(codifica la hormona de crecimiento) entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2)...46

Ilustración 17. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP GHR_F279Y

(implicado en la ganancia de peso) entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2)...47

INDICE DE CUADROS:

Cuadro 1.Diseño experimental para la evaluación genómica de embriones bovinos bipartidos y completos	22
Cuadro 2.Identificación de SNPs	31
Cuadro 3.Frecuencia relativa de genotipos por SNPs funcional en embriones bovinos bipartidos y completos (Bos taurus).	35

INFORMACIÓN GENERAL:

Título del Trabajo de Titulación: “Impacto de la clonación de embriones en los parámetros genómicos reproductivos en bovinos de carne (*Bos taurus*) mantenidos en ambiente tropical”

Línea de investigación:

Producción y biotecnología animal

Proyecto de investigación asociado: “Producción de embriones bovinos mediante biotecnología recombinante y clonación como una nueva estrategia para la optimización del rendimiento ganadero”, Convocatoria N° XVII del Fondo I+D+i de CEDIA.

Grupo de Investigación: Biodiversidad y Conservación Animal

INTRODUCCIÓN:

Las biotecnologías reproductivas aplicadas a los sistemas de producción bovina han experimentado un avance significativo, impulsado por la necesidad de acelerar el progreso genético, mejorar los indicadores productivos y optimizar la eficiencia reproductiva en condiciones ambientales desafiantes (1).

Dentro de este conjunto de herramientas, las técnicas de reproducción asistida como la superovulación, la transferencia embrionaria, el cultivo *in vitro*, la criopreservación y la bipartición embrionaria, han cobrado especial relevancia en el mejoramiento genético y reproductivo del ganado de carne (2).

La superovulación es una técnica *in vivo* que permite estimular la producción de múltiples ovocitos en una sola hembra donante mediante la administración controlada de gonadotrofinas. Estos ovocitos, una vez fertilizados por inseminación artificial, generan varios embriones que pueden ser recuperados por lavado uterino y posteriormente transferidos a hembras receptoras sincronizadas (2).

Entre las biotecnologías de micromanipulación embrionaria, la bipartición embrionaria (también denominada "clonación embrionaria manual") se ha convertido en una alternativa viable para generar gemelos monocigóticos genéticamente idénticos. Esta técnica consiste en dividir un embrión en estadio de mórula compacta o blastocisto en dos mitades viables, cada una con capacidad para desarrollarse de forma independiente tras su transferencia a hembras receptoras (1) (2). Esta metodología no solo permite maximizar el rendimiento de las hembras donantes, sino que también facilita estudios científicos relacionados con la genética comparativa, la fisiología embrionaria y la respuesta a diferentes ambientes uterinos.

La clonación embrionaria tiene como objetivo generar individuos con características productivas homogéneas a partir de un genotipo superior. En el contexto de la producción de carne bovina, esta estrategia representa una oportunidad para conservar y diseminar rápidamente genotipos élite que expresan rasgos deseables como mayor ganancia de peso, eficiencia alimentaria, calidad de canal y fertilidad adaptada a ambientes tropicales, en este sentido, la presente investigación se enfoca en la aplicación de técnicas de reproducción asistida,

particularmente la bipartición embrionaria, como vía para lograr la clonación de embriones en bovinos de carne bajo condiciones tropicales (3).

Un aspecto clave del enfoque moderno en reproducción animal es la integración del análisis genómico funcional, con énfasis en la identificación de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) y la expresión génica diferencial asociada a rasgos reproductivos y productivos. La genómica ha permitido establecer relaciones entre ciertos alelos y la eficiencia reproductiva, la calidad embrionaria, la respuesta a la criopreservación y la fertilidad de los reproductores (1) (2). El uso de herramientas genómicas complementa la clonación embrionaria al permitir la validación de la expresión de genes claves en embriones clonados y su relación con los resultados fenotípicos observados tras el nacimiento (3).

Actualmente, se reconocen tres vías principales para realizar la clonación de embriones bovinos: (1) la separación física de blastómeros en estadios tempranos; (2) la bipartición embrionaria en estadios más avanzados como mórula o blastocisto; y (3) la transferencia nuclear somática (SCNT). En este estudio, se empleará la bipartición embrionaria manual, una técnica que, si bien es menos compleja técnicamente que la SCNT, permite generar clones viables con elevada eficiencia en razas adaptadas al trópico y con menor impacto epigenético (1) (2).

En este contexto, el presente trabajo tiene como finalidad implementar una estrategia de clonación de embriones mediante reproducción asistida en bovinos de carne criados en ambiente tropical, con el propósito de validar su aplicabilidad y eficiencia bajo estas condiciones. Al mismo tiempo, se buscará establecer relaciones entre la viabilidad embrionaria y la arquitectura genómica de los clones generados, aportando evidencia científica sobre el potencial de esta biotecnología como herramienta de selección genética avanzada para sistemas ganaderos tropicales (4).

JUSTIFICACIÓN:

La eficiencia reproductiva en bovinos de carne (*Bos taurus*) constituye uno de los pilares fundamentales para garantizar la sostenibilidad de los sistemas ganaderos, especialmente en ambientes tropicales donde factores como el estrés calórico, las enfermedades endémicas y la baja calidad de los recursos forrajeros impactan

negativamente en la productividad. En este escenario, la incorporación de biotecnologías de reproducción asistida ha cobrado una importancia estratégica, permitiendo optimizar el uso de la genética superior, reducir los intervalos generacionales y mejorar la tasa de nacimientos viables (5).

Entre las técnicas más relevantes se destacan la superovulación y la transferencia embrionaria, que han demostrado ser herramientas efectivas para la multiplicación acelerada de hembras donantes elite. A estas se suma la bipartición de embriones, una forma de clonación embrionaria manual que permite generar gemelos homocigotos idénticos a partir de embriones en estadio de mórula o blastocisto. Esta técnica representa una opción práctica y económica para duplicar embriones de alto valor genético sin la complejidad de la clonación por transferencia nuclear (6).

Paralelamente, los avances en la genómica funcional han permitido profundizar en la comprensión de los mecanismos que regulan los rasgos reproductivos, productivos y adaptativos. La identificación de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en genes clave como LEP, GH1, GHR, CAPN1, CAST y MYO ha revelado su asociación con características de interés zootécnico como la fertilidad, el crecimiento, la eficiencia alimentaria, la calidad de carne y la tolerancia al estrés térmico. No obstante, la interacción entre estas herramientas biotecnológicas y la arquitectura genómica de los animales generados sigue siendo un campo poco explorado, especialmente en sistemas tropicales y en razas adaptadas a condiciones climáticas extremas (7).

El presente estudio busca abordar este vacío científico mediante la evaluación del impacto de la clonación embrionaria por bipartición sobre los parámetros genómicos reproductivos en bovinos de carne, criados bajo condiciones tropicales. Esta línea de investigación es altamente pertinente, ya que permitirá valorar la viabilidad de implementar esta tecnología como estrategia complementaria en programas de mejoramiento genético, orientados a incrementar la eficiencia reproductiva sin comprometer la variabilidad genética ni la adaptabilidad al ambiente (4).

Adicionalmente, este estudio ofrece un enfoque integrador al considerar la relación entre los rasgos productivos de carne y los parámetros reproductivos, reconociendo que ambos están mediados por mecanismos genéticos y epigenéticos comunes. Este enfoque resulta particularmente útil para sistemas ganaderos tropicales que requieren animales eficientes tanto en su reproducción como en su desempeño productivo, contribuyendo al desarrollo de modelos de producción más sostenibles, rentables y resilientes (8).

En adición, esta investigación se justifica no solo por su originalidad científica, sino también por su aplicabilidad en la realidad ganadera tropical. Su ejecución permitirá generar conocimientos fundamentales para el diseño de estrategias reproductivas de precisión, y fomentará la integración entre la reproducción asistida, la genómica animal y la selección basada en datos, pilares esenciales para la ganadería del futuro (9).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La reproducción eficiente en bovinos de carne es un factor crítico para garantizar la rentabilidad y sostenibilidad de los sistemas ganaderos, particularmente en regiones tropicales donde los desafíos climáticos, sanitarios y nutricionales comprometen la productividad animal. En estos entornos, los indicadores reproductivos como la tasa de concepción, la calidad embrionaria y la viabilidad fetal suelen verse afectados, generando pérdidas económicas significativas. Esta situación demanda el uso de estrategias biotecnológicas avanzadas que permitan optimizar la reproducción y maximizar el aprovechamiento del potencial genético de los animales de alto mérito productivo y reproductivo (10).

En este contexto, la clonación embrionaria mediante bipartición representa una alternativa viable para la multiplicación de individuos genéticamente superiores, al permitir la obtención de gemelos monocigóticos idénticos a partir de un solo embrión. Sin embargo, a pesar de su aplicabilidad técnica y relativa simplicidad frente a otras formas de clonación, existe un vacío de conocimiento respecto a los efectos que este procedimiento puede tener sobre los parámetros genómicos reproductivos de los animales resultantes, particularmente bajo condiciones de estrés ambiental como las presentes en los trópicos (11).

Adicionalmente, la relación entre los rasgos productivos como crecimiento, eficiencia alimentaria o calidad de carne y la fertilidad o competencia embrionaria, aún no ha sido suficientemente caracterizada desde una perspectiva genómica en embriones clonados. La integración de estas variables es crucial, ya que múltiples estudios sugieren que ciertos genes funcionales, como LEPTIN, GH1, GHR, CAPN1, CAST y MYO, cumplen roles duales en la regulación del metabolismo energético, el desarrollo muscular y los procesos reproductivos. No obstante, no se ha determinado si el proceso de bipartición afecta la conservación o expresión de estos marcadores genéticos clave (12).

Asimismo, en el ámbito tropical, se carece de estudios que analicen cómo la clonación embrionaria interactúa con el ambiente uterino y con la variabilidad epigenética inherente a los individuos, factores que podrían modular la expresión de genes asociados a la fertilidad, tolerancia al estrés y competencia embrionaria. Esta falta de evidencia limita la implementación masiva y segura de la bipartición embrionaria como herramienta complementaria en los programas de selección genética, en particular para razas bovinas adaptadas al trópico (13).

Por lo tanto, se plantea como problema central de esta investigación la necesidad de determinar si la clonación de embriones mediante bipartición tiene un impacto significativo en los parámetros genómicos productivos y su interacción con parámetros reproductivos de bovinos de carne (*Bos taurus*) mantenidos en ambiente tropical, y si esta biotecnología puede implementarse de manera segura y eficaz sin comprometer la expresión de genes funcionales asociados a la fertilidad y productividad animal (14).

Este planteamiento busca responder a la pregunta científica: ¿Cuál es el impacto de la clonación de embriones en los parámetros genómicos reproductivos de los bovinos de carne (*Bos taurus*) bajo condiciones de ambiente tropical, y cómo afecta la epigenética en la variabilidad de los genes? (16).

El abordaje de este problema no solo permitirá llenar vacíos fundamentales en el conocimiento científico, sino también ofrecerá herramientas prácticas para el desarrollo de programas reproductivos avanzados, sostenibles y adaptados a las realidades de la producción bovina tropical.

HIPÓTESIS O PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN:

Hipótesis Positiva

Hipótesis: La clonación de embriones en bovinos de carne (*Bos taurus*) tiene un impacto significativo en los parámetros genómicos reproductivos, modulando (disminuyendo, manteniendo o mejorando) la eficiencia reproductiva, aunque la variabilidad genética y la adaptabilidad al ambiente uterino podrían influir en los resultados.

PREGUNTA:

¿Cuál es el impacto de la clonación de embriones en los parámetros genómicos reproductivos de los bovinos de carne (*Bos taurus*) bajo condiciones de ambiente tropical, y cómo afecta la epigenética en la variabilidad de los genes determinados mediante análisis genómico?

Hipótesis Negativa

Hipótesis: La clonación de embriones en bovinos de carne (*Bos taurus*) no tiene un impacto significativo en los parámetros genómicos reproductivos, modulando (disminuyendo, manteniendo o mejorando) la eficiencia reproductiva, aunque la variabilidad genética y la adaptabilidad al ambiente uterino podrían influir en los resultados.

PREGUNTA:

¿Cuál no sería el impacto de la clonación de embriones en los parámetros genómicos reproductivos de los bovinos de carne (*Bos taurus*) bajo condiciones de ambiente tropical, y cómo afecta la epigenética en la variabilidad de los genes

Al realizar las validaciones que más está relacionada a nuestra investigación con la hipótesis positiva

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar el impacto de la clonación de embriones en los parámetros genómicos reproductivos de los bovinos de carne (*Bos taurus*) mantenidos en un ambiente tropical.

OBJETIVO ESPECÍFICOS:

- Analizar las diferencias en la expresión génica y los patrones de variabilidad genética entre los bovinos clonados bajo condiciones tropicales.
- Determinar los efectos de la clonación entre los parámetros reproductivos en bovinos mantenidos en un ambiente tropical.

CAPÍTULO I. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1. HISTORIA Y MÉTODOS DE LA BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA

La producción in vitro (PIV) de embriones y las tecnologías asociadas en bovinos han demostrado avances significativos en los últimos años, en parte impulsados por una mejor comprensión del potencial total de estas herramientas por parte de los usuarios finales. La combinación de PIV con semen sexado (SS) y selección genómica (GS) se está utilizando con éxito y ampliamente en América del Norte, América del Sur y Europa (1) (15).

Las principales ventajas que ofrecen estas tecnologías incluyen un mayor número de embriones y embarazos por unidad de tiempo, y una gama más amplia de posibles donantes hembras de las que recuperar ovocitos (incluidas hembras cíclicas abiertas y hembras de hasta 3 meses de gestación), incluidos terneros de alto índice genómico, un menor número de espermatozoides necesarios para producir embriones y mayores posibilidades de obtener el sexo deseado de la descendencia (2) (15).

Sin embargo, todavía hay aspectos no resueltos de la PIV de embriones que limitan una implementación más amplia de la tecnología, incluida la fertilidad potencialmente reducida por el uso de SS, la calidad reducida de los ovocitos después de la maduración de los ovocitos in vitro y la criotolerancia embrionaria más baja, lo que resulta en tasas de embarazo reducidas en comparación con los embriones producidos in vivo. Sin embargo, se han publicado resultados de investigación prometedores y se está trabajando para abordar las deficiencias actuales (1) (15).

1.2. TECNOLOGÍAS DE EMBRIONES BOVINOS

Las tecnologías embrionarias son una combinación de técnicas de reproducción asistida, biología celular, molecular y genómica. Su uso clásico en la cría de animales ha sido aumentar el número de genotipos superiores, pero con el avance de la biotecnología y la genómica se han convertido en una herramienta para la transgénesis y la genotipificación (1). La ovulación múltiple y la transferencia de embriones (MOET) están bien establecidas desde hace muchos años y aún representan un número importante de los embriones producidos en todo el mundo. Sin embargo, no se ha logrado ningún progreso en los últimos 20 años para aumentar el número de embriones transferibles y reducir los efectos secundarios en el rendimiento reproductivo de los donantes (2) (16).

La producción de embriones *in vitro* (PIV) es un enfoque más nuevo y más flexible, aunque es técnicamente más exigente y requiere conocimientos y equipos de laboratorio específicos que son muy importantes para la calidad de los embriones producidos. La clonación de células somáticas es un área en rápido desarrollo y una técnica muy valiosa para copiar genotipos superiores y producir o copiar animales transgénicos. Se espera que un mayor conocimiento de la biología de los ovocitos y embriones arroje nueva luz sobre los primeros eventos del desarrollo, incluidos los cambios epigenéticos y su efecto duradero en el recién nacido (1) (16). La fertilización *in vitro* (FIV) está reemplazando rápidamente la transferencia de embriones multiovulados como la estrategia preferida para la reproducción artificial del ganado (17).

1.3. HISTORIA CLONACIÓN Y DIVISIÓN DE EMBRIONES EN MAMÍFEROS:

La división de embriones es uno de los métodos más nuevos desarrollados en biotecnología reproductiva. En este método, después de dividir los embriones en etapas de 2, 4 e incluso 8 células, cada blastómero puede desarrollarse por separado, pero los embriones son genéticamente idénticos (1).

La división de embriones, como método en la clonación reproductiva, se emplea ampliamente en estudios de medicina reproductiva, como la investigación de enfermedades humanas, el tratamiento de la esterilidad, la donación de embriones

y la terapia génica. En el presente estudio, se revisan brevemente la clonación en mamíferos y los métodos de clonación. Además, se describen la división de embriones y los métodos comúnmente utilizados en la división de embriones y los logros recientes en este campo, así como las aplicaciones de la división de embriones en especies de ganado, animales primates y humanos (1) (15).

1.3.1. Clonación:

Los primeros 20 años de transferencia nuclear de células somáticas difícilmente pueden describirse como una historia de éxito. De manera controvertida, muchos de los factores que llevaron al fracaso no son características intrínsecas de la técnica en sí; malentendidos y acusaciones infundadas, junto con temores y barreras administrativas, impidieron a los clonadores superar el desafiante período inicial con dificultades obvias que son características comunes de un enfoque radicalmente nuevo. A pesar de algunos resultados prometedores de experimentos en su mayoría esporádicos y de pequeña escala, el futuro de la clonación sigue siendo incierto (1) (15).

1.3.2. Clonación en animales de granja:

A pesar de más de una década de esfuerzos de investigación, la clonación de animales de granja mediante transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) sigue siendo frustrantemente ineficiente. La ineficiencia se manifiesta en diferentes niveles, que actualmente no están bien integrados (18).

A nivel molecular, conduce a aberraciones genéticas, epigenéticas y transcripcionales generalizadas en embriones clonados. A nivel del organismo, estas anomalías en todo el genoma comprometen el desarrollo de fetos y descendientes clonados. Es necesario vincular causalmente defectos moleculares específicos con fenotipos clonados específicos, con el fin de diseñar tratamientos específicos para corregirlos. La eficacia de la clonación depende de la capacidad de la célula donante nuclear para reprogramarse completamente en un estado embrionario y de la capacidad de la célula receptora enucleada para llevar a cabo las reacciones de reprogramación. Se ha postulado que la reprogramabilidad del epigenoma de la célula somática del donante está influenciada por su estado de diferenciación (1).

Sin embargo, las comparaciones directas entre células con estados de diferenciación divergentes dentro de varios linajes somáticos no han encontrado pruebas concluyentes de esto. La elección de células madre somáticas como donantes no ha mejorado la eficiencia de la clonación, lo que indica que el tipo de célula del donante puede ser menos crítico para el éxito de la clonación. Por otro lado, las diferentes células receptoras varían en su capacidad de reprogramación. En bovinos, el uso de cigotos en lugar de ovocitos ha aumentado el éxito de la clonación (16) (18).

Las mejoras en la eficiencia de la clonación de ganado incluyen una mejor coordinación del tipo de célula del donante con la etapa del ciclo celular y la agregación de embriones clonados.

1.3.3. Clonación manual:

Dos inconvenientes importantes obstaculizan el avance de la transferencia nuclear de células somáticas en animales domésticos (9).

La transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) es el método más común para obtener animales clonados, donde las células somáticas se transfieren a ovocitos receptores enucleados (20).

Durante la última década, ha surgido un pequeño grupo alternativo de procedimientos, llamado clonación hecha a mano (HMC), que tiene la característica común de eliminar la zona pelúcida antes de la enucleación y fusión, lo que resulta en un requisito limitado (o nulo) de micromanipuladores (20).

Los beneficios de HMC son bajos costos de equipo, un procedimiento simple y rápido y una eficiencia *in vitro* comparable o superior a la de la transferencia nuclear tradicional. Los embriones creados mediante técnicas sin zona pueden criopreservarse y, aunque los datos aún son escasos, son capaces de establecer embarazos y dar lugar al nacimiento de terneros. La clonación manual también puede abrir el camino a la automatización parcial o total de la transferencia nuclear de células somáticas. En consecuencia, el enfoque sin zonas ni micromanipuladores puede convertirse en una alternativa útil a la clonación tradicional, ya sea en situaciones especiales o en general para la estandarización y aplicación generalizada de la transferencia nuclear de células somáticas (22).

1.3.4. Efectos de los tipos de células donantes en el desarrollo de embriones bovinos mediante tecnología de clonación por inyección de citoplasma:

La tecnología de clonación por inyección de citoplasma (CICT) es una técnica eficaz para evaluar el potencial de desarrollo de embriones clonados. En este estudio, investigamos los efectos del tipo de célula del donante sobre el potencial de desarrollo y la calidad de los embriones bovinos clonados. Se utilizaron fibroblastos adultos (AF) y células embrionarias (CE) como células donantes para clonar embriones bovinos mediante CICT. Inicialmente utilizamos células AF para desarrollar embriones clonados y luego cultivamos los blastocistos clonados del día 8 durante 10 días para obtener CE como células donantes para la segunda clonación de embriones. Descubrimos que los blastocistos bovinos clonados usando células AF habían reducido significativamente las tasas de desarrollo, la calidad del embrión y las proporciones de masa celular interna (ICM) con respecto al número total de células en comparación con aquellos que usaron CE como células donantes (23).

Además, hubo diferencias significativas en los genes relacionados con la ADN metiltransferasa, la desacetilación de histonas, la apoptosis y el desarrollo en la etapa de blastocisto en embriones clonados a partir de AF en comparación con los de embriones clonados a partir de EC. Nuestros resultados sugieren que el uso de CE como células donantes para la transferencia nuclear mejora la cantidad y calidad de los embriones clonados (20).

1.3.5. Tecnología de clonación y vitrificación para mejorar el progreso genético del ganado vacuno:

Los avances recientes en embriología y la investigación relacionada ofrecen posibilidades considerables para acelerar el mejoramiento genético en la cría de ganado. Dichos avances incluyen la optimización y estandarización de la producción de embriones en el laboratorio (fertilización *in vitro* - FIV), la introducción de un método altamente eficiente para la criopreservación (vitrificación) y una mejora espectacular en la eficiencia de la transferencia nuclear de células somáticas (clonación) en términos de esfuerzo requerido, costo y resultado general. La clonación hecha a mano (HMC), una versión simplificada de

la transferencia nuclear de células somáticas, ofrece la posibilidad de producir clones de forma relativamente sencilla y de bajo coste (17).

Un método de vitrificación potencialmente modificado utilizado en un laboratorio ubicado en una ubicación central podría dar como resultado crías clonadas que sean económicamente competitivas con los animales de élite producidos por medios más tradicionales (24).

Aparte de las cuestiones legales y de propiedad intelectual rutinarias, el principal obstáculo que obstaculiza la rápida adopción de estas tecnologías por parte de la industria ganadera es la falta de confianza de las fuentes científicas y comerciales. Una vez que se incrementa el apoyo de las partes interesadas, la aplicación combinada de estos métodos hace que un avance rápido hacia los rasgos deseables (crecimiento rápido, carne de vacuno de alta calidad, rendimiento reproductivo optimizado) sea una meta realista. Es difícil sobreestimar el impacto potencial de estas tecnologías en el avance genético de los rebaños de ganado vacuno en los que se busca mejorar el ganado (17).

1.4. BLASTOCIDOS EN LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES:

Comprender los mecanismos de formación e implantación de blastocistos es fundamental para mejorar la reproducción de los animales de granja, pero se ve obstaculizado por un suministro limitado de embriones. Aquí, desarrollamos un método eficiente para generar estructuras similares a blastocistos bovinos (denominadas blastoides) mediante el ensamblaje de células madre de trofoblasto bovino y células madre potenciales expandidas (25).

Los blastoides bovinos se parecen a los blastocistos en morfología, composición celular, transcriptomas unicelulares, crecimiento *in vitro* y capacidad de provocar el reconocimiento materno de la preñez después de la transferencia a las vacas receptoras. Los blastoides bovinos representan un modelo *in vitro* accesible para estudiar la embriogénesis y mejorar la eficiencia reproductiva en especies ganaderas (26).

1.5. DIVISION EMBRIONARIA:

La división de embriones fue una técnica que se demostró con elegancia desde tiempos muy tempranos con el objetivo de crear descendencia idéntica mediante gemelos artificiales, la división moderna de los mamíferos comenzó en el laboratorio se extrajo blastómeros individuales con una pipeta de embriones de oveja en etapa de 2 células incisos y los transfirió a ovocitos evacuados (9).

Este procedimiento también se lo realiza en bovinos con el objetivo de realizar una división embrionaria, convirtiéndolo en dos embriones por bipartición manual en laboratorio para luego ser transferidos a vacas receptoras y obtener crías idénticas (27).

1.6. MICROARN EMBRIONARIOS ESENCIALES PARA EL DESARROLLO DE EMBRIONES PREVIOS A LA IMPLANTACIÓN BOVINA:

Los microARN (miARN) son ARN pequeños no codificantes que regulan la expresión genética a nivel postranscripcional mediante la unión a ARN mensajeros específicos, induciendo su degradación o inhibiendo su traducción (28).

En el contexto reproductivo, los miARN están presentes en ovocitos adultos transcripcionalmente inactivos y en embriones preimplantacionales, los cuales exhiben una transcripción mínima antes de la activación del genoma embrionario (28).

Aunque la función exacta de los miARN en esta etapa aún no se comprende completamente, evidencia creciente sugiere que podrían desempeñar un papel crucial en el desarrollo temprano del embrión.

Un estudio realizado por McCallie et al. (2010) (29) determinó el patrón temporal de expresión de miARN durante el desarrollo preimplantacional en bovinos, utilizando secuenciación de ARN pequeño en ovocitos y embriones en estadios que incluyen: 1 célula, 2 células, 4 células, 8 células, 16 células, mórula y blastocisto.

Mediante el uso de α -amanitina, un inhibidor de la ARN polimerasa II, se logró diferenciar los miARN de origen materno de aquellos transcritos por el embrión,

revelando que la expresión de miARN embrionarios inicia en la etapa de dos células y se incrementa notablemente en las etapas de mórula y blastocisto (30).

Para estudiar la función de estos miARN, se silenció el gen DGCR8, esencial para la biogénesis de miARN, utilizando técnicas de ARN interferente y morfolidos. Este bloqueo inhibió no solo la expresión de miARN embrionarios, sino también la transición de mórula a blastocisto, lo que sugiere un papel funcional indispensable de los miARN en esta fase del desarrollo (30).

En conjunto, estos hallazgos implican un papel esencial de los miARN en la regulación del desarrollo embrionario preimplantacional bovino, modulando la transición crítica hacia el blastocisto y participando en la regulación génica temprana necesaria para la viabilidad y competencia embrionaria.(31)

1.7. FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN GANADO BOS TAURUS SUPEROVULADO:

La secuencia de eventos que conduce a la transferencia de embriones bovinos suele comenzar con la superovulación (9).

A pesar de una larga historia de investigación sobre la superovulación bovina, las aplicaciones comerciales significativas no comenzaron hasta principios de los años 1970. Durante unos 20 años después, la superovulación representó la principal herramienta para la producción de embriones de ganado (32)

A principios de la década de 1990, se inició la producción comercial in vitro (PIV) en ganado vacuno. Aunque la recogida de óvulos y la PIV se practican ahora comercialmente a gran escala, la superovulación y la recuperación de embriones mediante lavado siguen siendo un método generalizado y muy eficaz para la producción de embriones de ganado (17).

Esta revisión cubre tanto la historia como los efectos de múltiples factores sobre la superovulación en el ganado *Bos taurus*. Existen tres protocolos generales para una programación adecuada de los donantes antes de la FSH, de modo que haya folículos que respondan a las gonadotropinas disponibles (30) (33).

Los protocolos de superovulación varían ampliamente según la fuente de FSH, el diluyente utilizado, la cantidad y el momento de las inyecciones de FSH y el

momento y la utilización de diversas prostaglandinas, dispositivos internos controlados de liberación de progesterona, hormona liberadora de gonadotropinas y otros medios para controlar el desarrollo folicular y la ovulación. La cantidad de ovocitos que se pueden estimular para que crezcan y ovulen en cualquier donante determinado se puede estimar mediante ecografía guiada por ultrasonido o midiendo las concentraciones de hormona antimülleriana en la sangre (17).

Los factores relacionados con los animales que pueden influir en la eficacia de la superovulación incluyen la raza del ganado, la edad, la paridad, la genética, el estado de lactancia y la historia reproductiva. Además, se analizan la nutrición, el estrés, la estación, el clima y varios factores del semen (33).

1.8. EMBRIÓN PRODUCIDO IN VITRO EN LA PRODUCCIÓN GANADERA:

La abreviatura FIV se utiliza a menudo para referirse a todos los pasos que comprenden la fertilización *in vitro* de embriones, una serie de pasos que generalmente incluyen la maduración *in vitro*, la FIV y el cultivo *in vitro* (9).

El embrión producido mediante la maduración, fertilización y desarrollo embrionario de ovocitos *in vitro* es un recurso importante para el mejoramiento genético y tiene el potencial de mejorar la fertilidad femenina y de ser programado para producir crías con mayor capacidad de salud y producción (2).

El embrión cultivado también es un componente importante de diversas tecnologías, tanto existentes como potenciales, como la edición genética, la clonación nuclear de células somáticas, las tecnologías de células madre y la generación de gametos *in vitro*. Para aprovechar al máximo las oportunidades que ofrece el embrión producido *in vitro*, será necesario superar algunos obstáculos técnicos para la implementación rentable de un programa de transferencia de embriones (15).

Entre los objetivos de investigación para mejorar la penetración de la transferencia de embriones en la industria ganadera se encuentran el desarrollo de métodos para aumentar el suministro de ovocitos de hembras genéticamente de élite, aumentar la proporción de ovocitos que se convierten en embriones transferibles, mejorar la fracción de embriones que logran la preñez tras la transferencia, reducir el

desperdicio de preñez tras el diagnóstico de la misma e identificar las condiciones de cultivo para optimizar el fenotipo posnatal (15).

1.9. ANIMALES TRANSGÉNICOS Y SUS APLICACIONES:

En la actualidad, se están produciendo avances en biología molecular a un ritmo sin precedentes., uno de ellos es la capacidad de diseñar animales transgénicos, un animal transgénico es aquel cuyo genoma ha sido modificado para portar genes de otra especie o para utilizar técnicas de edición genómica animal para obtener rasgos específicos. Las características de los animales se pueden cambiar alterando deliberadamente el gen (o los genes) (34).

El gen de interés producido se coloca en una variedad de vectores, incluidos cromosomas artificiales de levadura, plásmidos bacterianos y virus (35).

Se utilizan varias técnicas, incluido el choque térmico, la electroporación, los virus, la pistola genética, la microinyección y los liposomas, para introducir el vector creado, que incluye el gen de interés, en la célula huésped. La transgénesis se puede llevar a cabo en las gónadas, el espermatozoides, los óvulos fertilizados y los embriones mediante microinyección de ADN, retrovirus, células madre y clonación (34).

El marcador transgénico más eficaz en la actualidad es la proteína fluorescente. Aunque la transgénesis plantea una serie de cuestiones éticas, esta revisión se centra en los fundamentos de la transgénesis animal y su uso en la industria, la medicina y la agricultura (36).

1.10. REPRODUCCIÓN DE VACAS LECHERAS BAJO LA INFLUENCIA DEL ESTRÉS TÉRMICO:

La producción lechera es vulnerable al calentamiento global y al cambio climático. Mejorar y mantener las tasas de concepción (TC) tiene una importancia primordial para la rentabilidad de cualquier empresa lechera. Existe una relación antagónica entre la fertilidad y la producción de leche, y la selección intensiva para la producción de leche ha deteriorado gravemente la eficiencia reproductiva. Independientemente de la geografía y la cría, las vacas lecheras modernas experimentan efectos de estrés por calor (EC) que conducen a una disminución de la fertilidad, pero empeora en los climas tropicales (37).

La disminución del EC conduce a un balance energético negativo, y las necesidades reproductivas de la vaca siguen sin satisfacerse. Los efectos adversos del EC comienzan desde el desarrollo del ovocito a lo largo de las últimas etapas y su competencia para la fertilización; el ciclo estral y el comportamiento estral; el desarrollo y la implantación del embrión; en el entorno uterino; e incluso se extienden hasta el ternero fetal. Incluso las vacas pueden volverse acíclicas bajo la influencia del EC (38).

La evaluación adecuada de la HS y el enfriamiento eficiente de los animales lecheros, independientemente de su etapa de vida en la granja, es la estrategia inmediata para reducir las disminuciones de la fertilidad. Otras estrategias de mitigación a largo y corto plazo para reducir las disminuciones de la fertilidad durante la HS incluyen el cuidado de la alimentación, la reducción de las tasas de enfermedades y mastitis, el uso de semen de toros enfriados, las inseminaciones artificiales (IA) programadas, las intervenciones hormonales aliadas y el uso de tecnología de transferencia de embriones (39).

1.11. METODOS DE DIAGNOSTICO DE GESTACION:

Para llevar a cabo el diagnóstico de gestación en el ganado bovino, se debe utilizar un método preciso, seguro, económico y que se pueda realizar de manera temprana. Aunque varias técnicas están actualmente disponibles en el mercado, otras siguen todavía en desarrollo, siendo posibles herramientas diagnósticas a tener en cuenta en un futuro de nuestra ganadería (40).

La detección de la gestación se realiza mediante palpación manual o ecografía transrectal y se determina la edad del feto cuando fue necesario sabe el tiempo de gestación estimado(41).

ETR (Ecografía transrectal) desde el día 28 en adelante se puede diagnosticar gestación, dependiendo del profesional por vía ecografía transrectal PTR (Palpación transrectal) se recomienda realizarla a partir de los 60 días post inseminación o transferencia embrionaria (40).

La ETR es una técnica basada en la utilización de ultrasonidos en modo B, permitiendo

Evaluar estructuras genitales como el útero y los ovarios. En la actualidad, se utiliza una sonda de tipo lineal, específica para uso vía transrectal en grandes animales y, con frecuencias de 5 a 7.5MHz, una de las estructuras a evaluar es la presencia de cuerpo lúteo (CL) gestacional, el cual aparece en el ovario como un área ovalada más ecogénica que el estroma ovárico (42).

El reconocimiento maternal de la gestación (RMG) es el proceso fisiológico que permite que el CL pueda perdurar, impidiendo la luteólisis, fenómeno que ocurre en vacas no gestantes (43).

1.12. DIVISION DE EMBRIONES:

La división de embriones es una biotecnología de la reproducción que se realiza en el laboratorio con el objetivo de obtener dos embriones similares, siendo una división celular que ocurre en el desarrollo temprano del embrión después de la ovulación (44).

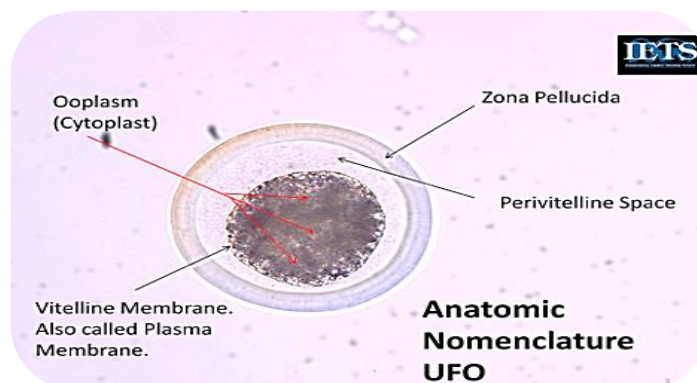


Ilustración 1. Anatomía del embrión:

Óvulos no fecundados (OVF) recolectados el día 7 post-estro. La clave principal para diferenciar este OVF de una mórula es que la membrana vitelina (MV) de un OVF es lisa alrededor del perímetro del citoplasma, a diferencia de una mórula que presenta pequeñas protuberancias (blastómeros) que sobresalen de la superficie del embrión. Un OVF es una entidad unicelular, mientras que una mórula es multicelular. Este óvulo, obviamente, tiene una sola célula con una membrana plasmática (MV) muy lisa (44).

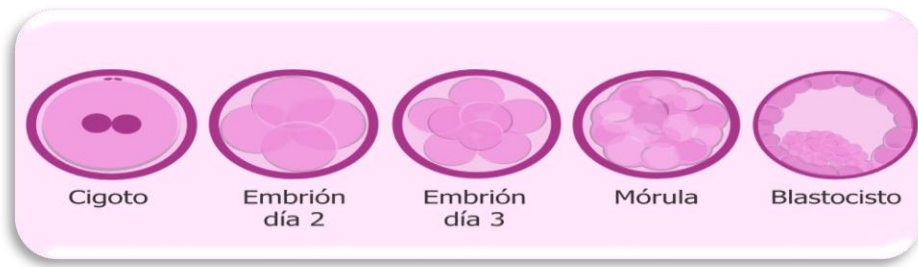


Ilustración 2. Morula

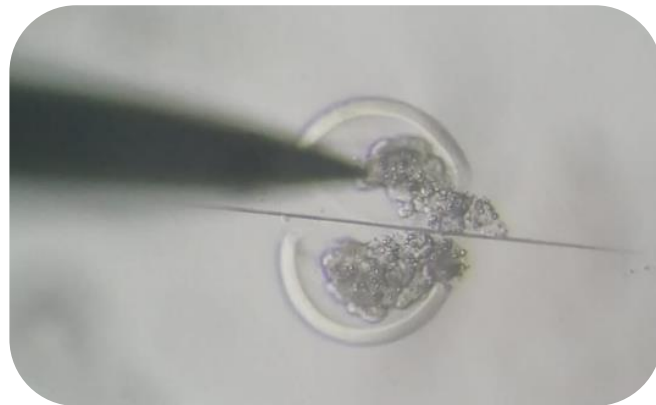


Ilustración 3. Bipartición embrionaria (mórula grado 1)

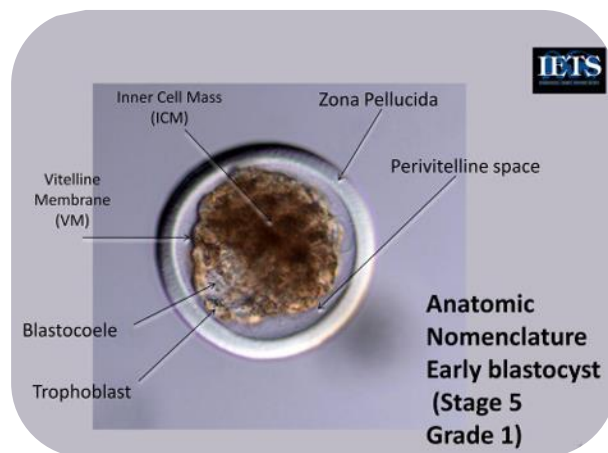


Ilustración 4. Embrión de grado 1

Embrión de grado 1. Blastocisto temprano recolectado el día 7(44).

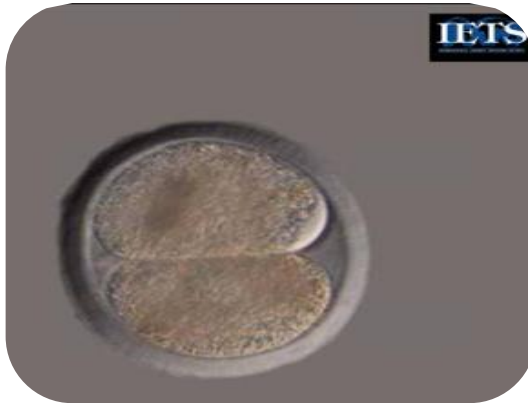


Ilustración 5. Embrión degenerado

Este embrión degenerado de dos células se recogió el día 7 después del inicio del estro.

Los dos blastómeros son muy grandes, de forma ovalada y aparentemente sanos, pero muertos.

Si esto hubiera sido recolectado del oviducto 48 horas después del inicio del estro, sería considerado un embrión bicelular sano (44).

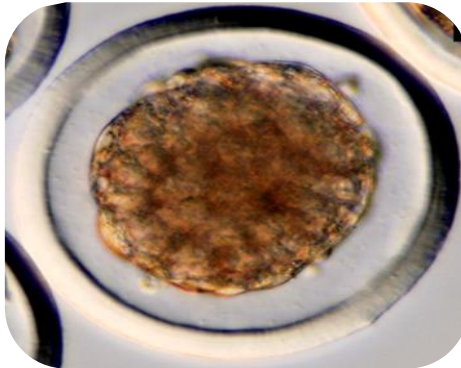


Ilustración 6. Mórula Grado 1.

Esta es una mórula anatómicamente perfecta



Ilustración 7. Embriones viables (blastocisto grado 1)

Estadio 4, Grado 1. Se trata de un blastocisto de día 7 anatómicamente perfecta. Hay muy pocos blastómeros extruidos fuera de la VM (44).

1.13. INTERFERÓN (IFN):

Hace treinta años, se identificó un nuevo interferón (IFN) tipo I mediante la clonación molecular de bibliotecas de ADNc construidas a partir de ARN extraído de embriones preimplantacionales ovinos y bovinos. Esta proteína se denominó finalmente IFN-tau (IFNT) para destacar su expresión dependiente del trofoblasto (45).

La función del IFNT no está relacionada con el sistema inmunitario. En cambio, interactúa con el sistema materno para iniciar el establecimiento y el mantenimiento de la gestación. Esta actividad es indispensable para la continuación de la gestación. Nuestra revisión describirá cómo el IFNT evolucionó a partir de otros IFN tipo I para funcionar en esta nueva función (46).

Los genes IFNT se han duplicado, probablemente mediante eventos de conversión, y las mutaciones les han permitido adaptarse a su nueva función en sintonía con la aparición de diferentes especies. Se han identificado múltiples polimorfismos de IFNT en bovinos, ovinos y caprinos (45).

1.14. ANÁLISIS GENÓMICO RASGOS REPRODUCTIVOS EN GANADO BOVINO:

Las pruebas genéticas son pruebas médicas que identifica cambios en genes, cromosomas o proteínas, sus resultados pueden confirmar o descartar una posible afección genética (47).

Facilitan la selección animal para rasgos económicamente importantes, los registros fenotípicos para un rasgo de individuos y sus parientes se utilizan para estimar los valores de reproducción empleando la mejor predicción lineal insesgada (BLUP mejor predicción lineal insesgada) para facilitar la selección animal para rasgos económicamente importantes (48).

Usos:

Se cree que, para la selección genética, la información a nivel de ADN puede acelerar la progresión genética en comparación con los datos fenotípicos solos (47).

Usos:

Es un método estadístico que utiliza relaciones entre individuos calculadas a partir de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) para capturar relaciones en loci de rasgos cuantitativos (QTL) (49).

Demostramos que la BLUP genómica aprovecha no solo el desequilibrio de ligamiento (LD) y las relaciones genético-aditivas, sino también la segregación para capturar relaciones en QTL. Se utilizaron simulaciones para estudiar las contribuciones de estos tipos de información a la precisión de los valores genéticos estimados genómicos (GEBV), su persistencia a lo largo de generaciones sin reentrenamiento y su efecto en la correlación de los GEBV dentro de las familias (49).

Los valores genéticos para la selección en el mejoramiento genético de animales y plantas

1.15. EPIGENÉTICA, EN EMBRIONES TRANSFERIDOS:

El metabolismo y la epigenética, que se regulan de forma recíproca en diversos tipos celulares, constituyen aspectos fundamentales en la adaptación celular al entorno (50).

Evidencia obtenida tanto en células madre como en células tumorales ha demostrado que el estado metabólico celular puede modificar el epigenoma, mientras que los mecanismos epigenéticos, a su vez, controlan la expresión de genes clave en rutas metabólicas, afectando de esta forma el perfil del metaboloma (51).

Esta interacción bidireccional es posible debido a que muchos metabolitos, como el acetil-CoA, α -cetoglutarato, S-adenosilmetionina (SAM) y NAD^+ , actúan como sustratos o cofactores de enzimas modificadoras de la cromatina, incluyendo histonas acetilasas/desacetilasas y metilasas/demetilasas (50).

En el contexto del embrión temprano, donde ocurre una intensa dinámica metabólica junto con una reprogramación epigenética profunda, comprender estas redes regulatorias resulta crucial para entender tanto los procesos de desarrollo embrionario como la influencia del entorno in vitro en la programación epigenética persistente (50) (52).

Por tanto, la optimización de los sistemas de cultivo embrionario in vitro no solo debe considerar las condiciones físicas y nutricionales, sino también cómo estas pueden inducir o prevenir modificaciones epigenéticas relevantes que podrían tener consecuencias a largo plazo en la salud y el rendimiento productivo del animal (17). En este contexto, revisiones recientes han enfocado su análisis en cómo el metabolismo afecta la reprogramación epigenética durante el desarrollo preimplantacional, destacando procesos clave como la acetilación y metilación de histonas y ADN (53).

Además, estudios emergentes en embriones bovinos han comenzado a documentar la presencia de modificaciones epigenéticas poco exploradas, como la lactilación de histonas, una marca derivada del metabolismo de lactato, con potencial papel regulador en etapas tempranas del desarrollo (54).

Estas nuevas evidencias abren prometedoras oportunidades para identificar objetivos epigenético-metabólicos que permitan diseñar estrategias precisas para mejorar la competencia embrionaria in vitro y su impacto a largo plazo.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. UBICACIÓN:

La investigación se desarrolló en la provincia de Morona Santiago, situada en la región amazónica del Ecuador. Esta provincia limita al norte con Pastaza, al sur con Zamora Chinchipe, al este con la República del Perú y al oeste con Chimborazo y Azuay. Se caracteriza por una notable heterogeneidad geográfica y climática, que abarca desde llanuras tropicales de selva húmeda hasta áreas montañosas de la vertiente oriental de la cordillera de los Andes. Esta diversidad confiere al territorio un potencial particular para evaluar la interacción entre genética animal, ambiente y sistemas productivos.

Las muestras biológicas utilizadas en el estudio fueron recolectadas en cinco cantones representativos: Sucúa, Pablo Sexto, Macas, Huamboya y Sinaí. Cada uno de estos sectores presenta condiciones ecológicas diferenciadas, las cuales pueden influir significativamente en la expresión fenotípica y el rendimiento productivo del ganado bovino (55).

Sucúa: Localizado en el centro de la provincia, presenta un relieve de valles interandinos con clima cálido-húmedo. Su economía está sustentada principalmente en la ganadería de doble propósito y la agricultura familiar.

Pablo Sexto: De topografía selvática y clima húmedo tropical, este cantón dispone de abundantes pastizales naturales y condiciones propicias para la cría extensiva de bovinos.

Macas: Capital provincial y centro económico de Morona Santiago, combina actividades agropecuarias, comerciales y de servicios, siendo la ganadería una de sus principales fuentes productivas (57).

Huamboya: Territorio de significativa presencia indígena Shuar, donde la ganadería se practica de forma complementaria a sistemas agroforestales y modelos de producción sostenible.

Sinaí: Se caracteriza por su orografía accidentada y limitaciones de accesibilidad, factores que inciden en el manejo pecuario y en la eficiencia de los sistemas ganaderos locales.

La selección de estos cantones como puntos de muestreo permite abordar de forma integral la diversidad ecológica y productiva de la región, aportando un marco representativo para analizar el impacto de la clonación embrionaria en condiciones tropicales reales (56).

Uno de los factores ambientales más relevantes para la producción bovina en esta zona es la altitud, dado su efecto directo sobre la fisiología animal, la termorregulación, la disponibilidad de forraje y la adaptación genotípica. Las altitudes registradas en los cantones evaluados oscilan entre los 600 y 1.300 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.):

Sucúa: 900–1.200 m.s.n.m.

Pablo Sexto: 600–800 m.s.n.m.

Macas: 950–1.050 m.s.n.m.

Huamboya: 1.000–1.300 m.s.n.m.

Sinaí: 750–900 m.s.n.m.

Estas altitudes, en conjunto con la temperatura cálida y la alta humedad relativa, generan un entorno favorable para la ganadería extensiva. La presencia de pastizales de mediana calidad, junto con la estabilidad térmica, permiten mantener una productividad aceptable, siendo condiciones idóneas para estudiar la eficiencia y adaptabilidad genómica de embriones bovinos clonados en contextos tropicales diversos (55).

2.1.1. Pluviosidad:

La pluviosidad constituye un factor agroecológico crítico para la producción bovina, ya que incide directamente en la calidad y disponibilidad de los pastos, el

acceso al recurso hídrico y las condiciones sanitarias del hato. Un exceso o déficit de precipitaciones puede afectar negativamente tanto la oferta forrajera como la eficiencia reproductiva del ganado, especialmente en sistemas de manejo extensivo (57).

En la provincia de Morona Santiago, el régimen pluviométrico se caracteriza por ser altamente húmedo, con precipitaciones abundantes distribuidas a lo largo de la mayor parte del año. Este comportamiento climático, típico de la región amazónica, crea un ambiente propicio para el crecimiento vegetativo, pero también puede incrementar el riesgo de enfermedades infecciosas y parasitarias si no se aplican prácticas sanitarias adecuadas (57).

Los cantones seleccionados para este estudio presentan valores promedio anuales de precipitación que oscilan entre los 2.000 y 4.000 milímetros, aunque con una distribución irregular a lo largo del año. Los meses con mayor concentración de lluvias corresponden generalmente a marzo, abril y mayo, mientras que los periodos de menor pluviosidad suelen registrarse entre septiembre y noviembre (27).

Este patrón de humedad variable influye directamente en la disponibilidad estacional de pasto y puede generar fluctuaciones en la condición corporal de las hembras donantes y receptoras, afectando potencialmente los resultados reproductivos en técnicas como la transferencia o clonación de embriones. Por tanto, comprender la dinámica del régimen hídrico local es fundamental para interpretar el comportamiento reproductivo y la respuesta genómica del ganado bovino bajo condiciones tropicales húmedas (57).

2.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN:

La presente investigación corresponde a un estudio experimental de carácter cuantitativo, diseñado con el propósito de evaluar el impacto de la clonación embrionaria sobre parámetros genómicos y productivos en bovinos de carne (*Bos taurus*) mantenidos bajo condiciones tropicales. El objetivo principal fue determinar la viabilidad, eficiencia biológica y el potencial de esta biotecnología reproductiva como herramienta estratégica para optimizar la productividad ganadera en entornos con condiciones climáticas adversas.

Mediante un diseño experimental controlado, se analizaron tanto los efectos directos de la clonación embrionaria sobre el rendimiento zootécnico de los individuos, como las variaciones genéticas inducidas por los procedimientos de superovulación, micromanipulación y bipartición de embriones. Esta aproximación integradora permitió vincular los perfiles genómicos observados con los posibles efectos funcionales en genes clave asociados a la eficiencia alimentaria, crecimiento muscular, terneza de carne y parámetros reproductivos, generando evidencia robusta sobre la aplicabilidad de estas tecnologías en sistemas de producción bovina en ambientes tropicales.

2.3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN:

El diseño de la investigación se planteó como un estudio de tipo longitudinal, que implicó el seguimiento sistemático de los animales a lo largo de todas las fases críticas del protocolo de biotecnología reproductiva, incluyendo la inducción de superovulación, colecta de embriones, bipartición embrionaria, transferencia a receptoras y evaluación de diagnóstico de gestación.

La estructura experimental contempló la conformación de dos grupos comparativos: un grupo experimental integrado por embriones clonados mediante bipartición, y un grupo control compuesto por embriones completos no manipulados. Esta disposición permitió evaluar, bajo condiciones estandarizadas, los efectos genómicos y productivos asociados al uso de tecnologías reproductivas avanzadas.

La selección de los animales incluidos en el estudio se realizó bajo criterios rigurosos, considerando raza, estado sanitario, condición fisiológica y antecedentes reproductivos, con el objetivo de reducir la variabilidad biológica y garantizar la representatividad y comparabilidad de los resultados obtenidos.

Cuadro 1. Diseño experimental para la evaluación genómica de embriones bovinos bipartidos y completos

Grupo experimental	Tipo de embrión	Tratamiento aplicado	Número de embriones (n)	Etapas de desarrollo	Análisis genómico realizado	Genes evaluados (SNPs)
Grupo 1	Bipartido	Bipartición embrionaria <i>in vitro</i>	32	Blastocisto expandido	Genotipificación por PCR en tiempo real y secuenciación	CAPN1_316, CAPN1_530, CAST_2870, MYO_C313Y, MYO_E226X, MYO_Q204X, LEPTIN_A252T, LEPTIN_A963, GH1_2291, GHR_F279Y
Grupo 2	Completo (control)	Sin manipulación (control)	22	Blastocisto expandido	Genotipificación por PCR en tiempo real y secuenciación	CAPN1_316, CAPN1_530, CAST_2870, MYO_C313Y, MYO_E226X, MYO_Q204X, LEPTIN_A252T, LEPTIN_A963, GH1_2291, GHR_F279Y

Fuente: *Elaboración Propia.*

El diseño experimental compara dos tipos de embriones bovinos (bipartidos vs. completos), sometidos o no a manipulación mecánica (splitting embryos). Todos los embriones fueron analizados en el estadio de blastocisto expandido. Se utilizaron herramientas de genotipificación molecular para detectar la presencia y frecuencia de SNPs funcionales en genes relacionados con la calidad de la carne, el crecimiento muscular, la eficiencia alimentaria y parámetros reproductivos.

2.4. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN:

La metodología empleada en esta investigación integró procedimientos reproductivos tanto *in vivo* como *in vitro*, orientados a la obtención, manipulación micromanipulada y transferencia de embriones bovinos. Estas técnicas fueron complementadas con herramientas avanzadas de biología molecular, que

permitieron llevar a cabo un análisis genético detallado a nivel de marcadores moleculares (SNPs), con el objetivo de caracterizar y comparar la arquitectura genómica entre los embriones clonados y completos.

2.4.1. Técnicas utilizadas

2.4.1.1. Selección de donantes de embriones

La elección adecuada de las vacas donantes constituye un factor crítico para el éxito de los programas de clonación y transferencia embrionaria, ya que influye directamente en la calidad de los embriones obtenidos y en la eficiencia reproductiva del proceso. En este estudio, se seleccionaron hembras de la raza Charolais, reconocida por su destacado mérito genético y su rendimiento sobresaliente en la producción de carne, particularmente por su alta tasa de conversión alimenticia, crecimiento rápido y conformación muscular superior.

La selección de las donantes se basó en los siguientes criterios técnicos:

Edad reproductiva óptima: Se incluyeron vacas adultas entre 3 y 7 años, con historial reproductivo favorable, ciclos estrales regulares y sin antecedentes de infertilidad.

Condición corporal adecuada: Los animales presentaban una puntuación entre 3 y 4 en la escala estándar de condición corporal (1 a 5), lo que indica un balance energético suficiente para responder eficazmente a tratamientos de superovulación y garantizar una buena recuperación postcolecta.

Estado sanitario: Se seleccionaron únicamente animales clínicamente sanos, libres de enfermedades infecciosas y parasitarias, y con esquemas sanitarios actualizados (vacunación y desparasitación), en cumplimiento con las normativas zoonosanitarias de la región amazónica.

Esta rigurosa selección garantizó la homogeneidad fisiológica del grupo de donantes y contribuyó a minimizar la variabilidad experimental, permitiendo una evaluación precisa del impacto genómico de la clonación embrionaria en condiciones tropicales.

2.4.1.2. Selección de receptoras de embriones

Las vacas receptoras cumplen una función esencial en los programas de transferencia y clonación embrionaria, ya que constituyen el ambiente uterino donde se desarrolla la gestación, influyendo directamente en la supervivencia embrionaria, la eficiencia reproductiva y la calidad del producto final.

En este estudio se seleccionaron hembras bovinas mestizas, ampliamente utilizadas en sistemas tropicales por su adaptabilidad, rusticidad y buena respuesta fisiológica. Los criterios aplicados para su selección fueron los siguientes:

Sincronización reproductiva controlada: Las receptoras fueron sometidas a protocolos hormonales estandarizados de sincronización del ciclo estral (incluyendo prostaglandinas y dispositivos intravaginales con progesterona), con el fin de garantizar la coincidencia precisa entre el estadio fisiológico del útero y la etapa de desarrollo del embrión a transferir (mórula o blastocisto).

Condición corporal y salud general: Al igual que las donantes, las receptoras seleccionadas presentaban un estado corporal adecuado (3 a 4 en la escala de 1 a 5), con reservas energéticas suficientes para sostener una gestación inicial. Además, se aseguraron libres de patologías reproductivas o sistémicas que pudieran comprometer la implantación o el desarrollo fetal, cumpliendo con protocolos sanitarios vigentes (vacunación y desparasitación).

Esta selección y manejo preciso de las receptoras garantizó condiciones uterinas óptimas para la transferencia embrionaria y permitió reducir al mínimo los factores ambientales o fisiológicos que pudieran interferir con la evaluación de los parámetros genómicos y reproductivos del estudio.

2.4.1.3. Protocolo de superovulación

El protocolo de superovulación implementado en este estudio tuvo como objetivo estimular el desarrollo simultáneo de múltiples folículos ováricos, a través de la administración controlada de hormona foliculoestimulante recombinante bovina (BSCR-FSH) (58).

Esta fue aplicada en un esquema de dosis decrecientes durante un período de cuatro días consecutivos, con el fin de inducir una respuesta ovárica homogénea y

predecible, optimizando así la sincronía folicular y la producción de ovocitos viables (18).

La utilización de FSH recombinante ha demostrado ofrecer mayor consistencia en la respuesta superovulatoria en comparación con preparaciones de origen porcino, reduciendo la variabilidad individual y mejorando la calidad de los embriones producidos (18).

Posteriormente, se administró prostaglandina F2 α (PGF2 α) para inducir la luteólisis y sincronizar la ovulación, asegurando que la colecta embrionaria coincidiera con el momento óptimo de maduración y fertilización in vivo. Esta estrategia hormonal ha sido ampliamente validada en protocolos de sincronización en bovinos, mejorando la eficiencia del programa de recolección embrionaria (59).

El protocolo utilizado fue adaptado conforme a la metodología propuesta por Gutiérrez- Reinoso et al., (2021) (60), específicamente ajustado a las condiciones fisiológicas y ambientales de bovinos de carne mantenidos en regiones tropicales.

La adecuada respuesta al tratamiento fue monitoreada mediante ecografía ovárica transrectal, con el fin de verificar el desarrollo folicular y la regresión del cuerpo lúteo. Además, se realizó el registro del comportamiento estral como parámetro complementario, permitiendo validar la sincronización del ciclo y asegurar la calidad de la producción embrionaria previa a la micromanipulación (61).

2.4.1.4. Colecta de embriones

La recuperación embrionaria se efectuó en el día 7 posterior al estro e inseminación artificial, momento óptimo en el que los embriones se encuentran en el tracto uterino en estadio de mórula o blastocisto. El procedimiento se llevó a cabo mediante lavado uterino no quirúrgico (flushing transcervical), técnica ampliamente validada por su eficiencia y bajo nivel de invasividad (16).

Para ello, se utilizó una solución estéril de fosfato bufferado (PBS) precalentada a 24 °C, la cual fue introducida cuidadosamente en el lumen uterino a través de una sonda de Foley. Posteriormente, el fluido fue recuperado por drenaje gravitacional y recolectado en filtros estériles diseñados para la retención de estructuras embrionarias (62).

Los embriones recuperados fueron identificados y evaluados bajo estereomicroscopía de bajo aumento, clasificándolos de acuerdo con su morfología, grado de compactación y estadio de desarrollo (mórula temprana, mórula compacta, blastocisto, blastocisto expandido), siguiendo los criterios establecidos por la International Embryo Transfer Society (IETS). Esta clasificación fue determinante para seleccionar aquellos embriones viables que posteriormente serían destinados al proceso de bipartición o transferencia directa (63).

2.4.1.5. Clasificación de embriones:

La evaluación y clasificación de los embriones se realizó conforme a los criterios establecidos por la International Embryo Transfer Society (IETS), los cuales consideran parámetros morfológicos y de desarrollo embrionario para determinar su viabilidad y calidad reproductiva (63).

El proceso de clasificación incluyó la observación estereomicroscópica de los siguientes estadios:

- Mórula compacta: Embrión constituido por una masa celular densa, sin evidencia de cavitación.
- Inicio de blastulación: Presencia incipiente de cavidad blastocélica con acumulación de fluido intraembrionario.
- Blastocisto temprano: Formación de cavidad bien definida con diferenciación clara entre trofoblasto y masa celular interna (ICM).
- Blastocisto expandido: Aumento significativo del diámetro embrionario y adelgazamiento progresivo de la zona pelúcida.
- Embrión eclosionado o en proceso de eclosión: El embrión comienza a liberarse o ha salido completamente de la zona pelúcida, indicando un alto potencial de implantación (66).

Solo se seleccionaron para bipartición y transferencia aquellos embriones clasificados como Grado 1 (excelente) y Grado 2 (bueno), y que se encontraban en estadio de mórula compacta a blastocisto expandido, con el fin de asegurar una mayor tasa de implantación, preñez y desarrollo fetal exitoso, tal como lo respaldan estudios previos en clonación embrionaria en bovinos (64).

2.4.1.6. Método de bipartición de embriones (Splitting Embryo):

La bipartición de embriones se realizó bajo condiciones estrictas de esterilidad en un ambiente controlado de laboratorio, utilizando un sistema de micromanipulación asistida bajo estereomicroscopía. Esta técnica, también conocida como splitting embrionario, permite dividir un embrión de alta calidad en dos mitades viables, cada una con potencial de desarrollo individual (64).

El procedimiento se desarrolló de la siguiente manera:

- Se utilizó un microscopio invertido Olympus acoplado a un micromanipulador de tipo joystick (ABTechnology®). Los embriones seleccionados fueron colocados en una placa Petri de 60 mm que contenía solución estéril Splitting Embryos ABT®, y posicionados cuidadosamente para garantizar estabilidad durante la manipulación (65).

- Mediante el uso de una microcuchilla de alta precisión, se efectuó una incisión controlada a lo largo del eje meridional del embrión, asegurando que cada mitad resultante contuviera una proporción representativa tanto de la masa celular interna (ICM) como del trofoblasto, independientemente de si se trataba de una mórula compacta o un blastocisto expandido (66).

- Las dos mitades obtenidas fueron transferidas inmediatamente a un medio de cultivo Holding Plus específico, donde permanecieron durante 30 minutos bajo condiciones controladas de temperatura (38.5 °C) y atmósfera (5% CO₂) para evaluar su viabilidad, integridad estructural y capacidad de reexpansión. Solo aquellas mitades que mostraron signos de recuperación celular y estabilidad morfológica fueron seleccionadas para transferencia embrionaria a las receptoras (67).

Este protocolo asegura la conservación de la competencia embrionaria post-micromanipulación y maximiza las tasas de éxito en términos de implantación y desarrollo fetal (67).

2.4.1.7. Transferencia de embriones:

Los demi-embryones previamente evaluados como viables fueron transferidos a hembras receptoras sincronizadas mediante un protocolo estandarizado de inseminación a tiempo fijo (IATF), siguiendo metodologías validadas en

transferencia embrionaria en bovinos (9) (61). El procedimiento se realizó mediante técnica no quirúrgica transcervical, bajo condiciones de asepsia y mínima invasividad, garantizando un entorno fisiológico adecuado para la implantación (68).

El protocolo de transferencia incluyó los siguientes pasos:

- Preparación del animal receptor: Se realizó asepsia rigurosa de la región perineal, seguida de la aplicación de anestesia epidural sacrococcígea utilizando lidocaína al 2%, con el objetivo de inducir una sedación ligera del tren posterior y minimizar el estrés durante el procedimiento (68).
- Inserción del dispositivo de transferencia: Se utilizó un catéter IMV de 0,25 cc especializado para transferencia embrionaria, el cual fue introducido cuidadosamente a través del canal cervical hasta alcanzar el cuerno uterino ipsilateral al ovario portador de un cuerpo lúteo funcional, previamente identificado por palpación rectal o ecografía (69).
- Deposición del demi-embrión: El embrión fue liberado suavemente en la luz del cuerno uterino, cerca de la unión uterotubárica, asegurando una localización anatómica óptima que favorezca la implantación. Se tuvo especial cuidado en minimizar el trauma endometrial y evitar contracciones uterinas inducidas por manipulación (70).

Este procedimiento estandarizado permitió mantener la viabilidad post-transferencia de los demi-embriones y favoreció tasas de preñez adecuadas, representando una estrategia eficiente para evaluar el comportamiento reproductivo de embriones clonados en condiciones tropicales (67).

2.4.1.8. Diagnóstico de gestación:

El diagnóstico de gestación fue realizado mediante ultrasonografía transrectal de alta resolución, llevada a cabo en dos momentos clave: a los 30 y 60 días posteriores a la transferencia embrionaria. Esta técnica permitió confirmar la preñez de forma temprana y no invasiva, evaluando los principales indicadores de viabilidad embrionaria y desarrollo fetal (71).

Durante la ecografía se registraron los siguientes parámetros:

- Presencia de la vesícula embrionaria y su localización dentro del lumen uterino.

- Detección del latido cardíaco fetal, como confirmación de vitalidad embrionaria.
- Evaluación del crecimiento y morfología fetal, en función del estadio gestacional estimado, verificando la progresión del desarrollo embrionario conforme a los estándares fisiológicos para bovinos (72).

Este procedimiento diagnóstico permitió determinar la eficiencia reproductiva post-transferencia y monitorear el impacto de la bipartición embrionaria sobre el éxito de implantación y gestación temprana en bovinos de carne bajo condiciones tropicales (71).

2.4.1.9. Análisis genómico:

Para la caracterización genómica de los individuos nacidos, se recolectaron muestras biológicas mediante la extracción de aproximadamente 60 folículos pilosos de la región caudal de cada ternero. Este tipo de muestra, ampliamente validado por su facilidad de obtención y adecuada conservación del material genético, fue utilizado como fuente primaria de ADN genómico (73).

La extracción del ADN se realizó utilizando kits comerciales estandarizados, diseñados específicamente para tejidos queratinizados, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La calidad y concentración del ADN extraído fueron verificadas mediante espectrofotometría UV-Vis, evaluando la pureza a través de los coeficientes de absorción a 260/280 nm (74).

Posteriormente, se procedió a la amplificación y secuenciación de loci génicos asociados a características productivas y de calidad de carne, con especial énfasis en la identificación de polimorfismos de nucleótido único (SNPs). Estos marcadores moleculares permitieron comparar la arquitectura genómica entre terneros nacidos de embriones bipartidos y completos, estableciendo posibles asociaciones con rasgos de interés zootécnico y reproductivo (75).

2.4.1.10. Extracción de ADN y Tipificación genes de Interés Comercial:

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de folículos pilosos utilizando la tecnología de perlas magnéticas mediante el kit MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (Applied Biosystems™), siguiendo estrictamente los protocolos y recomendaciones proporcionados por el fabricante (76). Este método

permitió obtener ADN de alta calidad a partir de tejidos queratinizados, adecuado para análisis genómicos de alta resolución (77).

Posteriormente, la concentración y pureza del ADN extraído fueron evaluadas mediante espectrofotometría UV-Vis, empleando el equipo NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific™), verificando los índices de absorbancia 260/280 nm para confirmar la integridad del material genético (76).

Una vez asegurada la calidad del ADN, se procedió a la genotipificación de las muestras mediante arrays comerciales de alta densidad. Se utilizaron los chips Axiom™ Bovine Genotyping v3 Array (Thermo Fisher), que contienen aproximadamente 63.000 SNPs, y el Axiom™ Bovine Genotyping 100K Array, con una cobertura de 100.000 SNPs distribuidos en todo el genoma bovino. En algunos casos, se aplicaron arrays equivalentes con características similares de cobertura genómica (77).

El proceso de hibridación y escaneo fue llevado a cabo mediante el sistema automatizado GeneTitan™ Multi-Channel (MC) Instrument, diseñado para plataformas de genotipificación masiva en formato array (78). La interpretación y análisis de los datos obtenidos se realizaron utilizando el software especializado Axiom™ Analysis Suite, siguiendo las recomendaciones técnicas del fabricante para el procesamiento de llamadas genotípicas, control de calidad y filtrado de SNPs (79).

Este enfoque permitió obtener perfiles genéticos robustos y comparables entre los terneros provenientes de embriones bipartidos y completos, facilitando la identificación de variaciones alélicas relevantes para características productivas y reproductivas (79).

2.4.1.11. Análisis bioinformático:

El análisis bioinformático de los datos genotípicos obtenidos a partir del chip de alta densidad para bovinos fue implementado inicialmente utilizando el software Axiom™ Analysis Suite versión 4.0.3.3 (Thermo Fisher Scientific®), el cual fue desplegado sobre una máquina virtual alojada en la infraestructura de Google Cloud Platform, mediante un bucket de procesamiento asignado a Biotecgen SAS. Para el mapeo y alineamiento de las secuencias, se utilizó como referencia el genoma

bovino ARS-UCD1.2 (bosTau9, NCBI), reconocido por su alta resolución y actualización estructural (80).

En la fase inicial, se importaron los archivos de microarreglos en formato CEL, generados por el sistema GeneTitan™, y se procedió al cálculo automatizado de las métricas de calidad, incluyendo Dish Quality Control (DishQC), taxa de calidad global (QC call rates) y evaluación por placas (Plate Quality Metrics), según los parámetros estándar recomendados por el fabricante Thermo Fisher (2022) (80).

Una vez superadas las etapas de control de calidad, se ejecutó el proceso de llamado de genotipos (genotype calling), asignando cada variante a su correspondiente alelo con base en los datos del array y el genoma de referencia. El análisis posterior de variantes incluyó la identificación, anotación y filtrado de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), así como la detección de pequeñas inserciones y deleciones (indels), utilizando filtros de confianza y cobertura que garantizaron la robustez del dataset (81).

Este enfoque permitió construir perfiles genómicos comparativos de alta resolución, fundamentales para evaluar la arquitectura genética y sus implicaciones productivas y reproductivas en embriones bovinos clonados versus no clonados bajo condiciones tropicales (81).

Cuadro 2.Identificación de SNPs:

GEN	SNP	DESCRIPCION	OBSERVACION
CALPAÍNA	CAPN1_316 CAPN1_530	Diversos estudios han demostrado que los animales portadores de los alelos favorables para los SNPs localizados en el gen CAPN1, tienden a presentar carnes más tiernas.	El individuo posee cero (0); una (1); o dos copias (2), del alelo favorable respectivamente. NA alelo no Determinado
CALPASTATINA	CAST_2870	El gen de la calpastatina se expresa en el musculo esquelético	El individuo posee cero (0) ;una (1) ; o dos copias (2), del alelo

		inhibiendo la proteólisis de la carne post mortem, esto favorece la variabilidad de la terneza de la carne	favorable respectivamente.
MIOSTATINA	MYO_C313Y MYO_E226X MYO_Q204X	Variantes en: C313Y E226X,E291X, Q204x, S105C, F94L. Podrían ser clasificadas como No beneficiosas porque a pesar de que están asociadas con un aumento de la terneza de la carne, causan doble musculatura, altos pesos al nacimiento e incrementos de la distocia que pueden causar dificultad en el parto.	El individuo posee cero (0); una (1); o dos copias (2) , del alelo favorable respectivamente.
LEPTINA	LEPTIN_A252T LEPTIN_A963	Este gen interviene en la regulación del apetito, la deposición de grasa y el metabolismo del animal, también puede afectar rasgos como la producción de leche, el equilibrio energético y la reproducción.	El individuo posee cero (0) ;una (1) ; o dos copias (2), del alelo favorable respectivamente.
GH1	GH1_2291	El gen de la hormona del crecimiento bovina, desempeña una importante función en la lactancia y procesos de crecimiento. El alelo favorable está	El individuo posee cero (0) ; una (1) ; o dos copias (2) , del alelo favorable respectivamente.

		asociado con una mayor producción de grasa láctea y porcentaje de proteína.	
GHR	GHR_F279Y	GHR juega un papel importante en el inicio y mantenimiento de la lactancia. El alelo "favorable": Aumenta la producción de leche, caseína y lactosa y disminuye la producción de proteínas y grasas.	El individuo posee cero (0); una (1); o dos copias (2), del alelo favorable respectivamente.

Fuente: Elaboración Propia

La identificación de estos polimorfismos se realizó mediante PCR y secuenciación directa, permitiendo correlacionar las variantes genéticas con los parámetros productivos observados en los bovinos clonados.

2.5. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y PROCESAMIENTO DE DATOS:

El análisis de los datos generados en esta investigación se realizó mediante la aplicación de herramientas estadísticas robustas y técnicas bioinformáticas especializadas, con el propósito de evaluar la asociación entre los polimorfismos genéticos identificados y los parámetros productivos observados en bovinos clonados mantenidos en ambientes tropicales (79).

Para el análisis genético, se utilizaron secuencias de ADN extraídas a partir de folículos pilosos de los animales nacidos, las cuales fueron procesadas mediante metodologías de amplificación génica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguidas de secuenciación Sanger o, en algunos casos, mediante plataformas de secuenciación de nueva generación (NGS). Estas técnicas permitieron la detección precisa de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en genes relevantes vinculados con características productivas, como la calidad composicional de la leche y la eficiencia metabólica del animal (49).

La genotipificación fue realizada utilizando software bioinformático especializado, lo que permitió identificar el genotipo específico de cada individuo en relación con los SNPs evaluados. Posteriormente, los datos genéticos fueron correlacionados con indicadores fenotípicos productivos, incluyendo la cantidad de leche producida, su composición (grasa, proteína, sólidos totales) y parámetros tecnológicos asociados al rendimiento industrial de la leche (47).

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando plataformas como SPSS® y R, mediante las cuales se aplicaron modelos de análisis de varianza (ANOVA), regresiones lineales múltiples y pruebas de significancia ($p < 0.05$) para determinar diferencias genotípicas entre los grupos experimentales (clonados vs. controles). Esta metodología permitió establecer asociaciones significativas entre determinados SNPs y el desempeño productivo, lo que respalda la hipótesis de que la clonación embrionaria puede conservar o incluso potenciar alelos favorables bajo condiciones ambientales tropicales (82).

En conjunto, estos resultados refuerzan el potencial de la clonación como herramienta de mejora genética en sistemas ganaderos tropicales, al demostrar que los perfiles genómicos obtenidos se correlacionan positivamente con rasgos productivos clave (24).

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el siguiente apartado se presentan los resultados del análisis comparativo de frecuencias genotípicas en SNPs estratégicos relacionados con la funcionalidad productiva en bovinos clonados y no clonados, evaluando diferencias entre embriones bipartidos y completos como modelo para identificar efectos potenciales de la clonación sobre la arquitectura genética bajo condiciones tropicales.

Cuadro 3. Frecuencia relativa de genotipos por SNPs funcional en embriones bovinos bipartidos y completos (*Bos taurus*).

SNP	Tipo embrión	GENOTIPO/N COPIAS		
		0	1	2
CAPN1_316	Bipartido	8/32 (25)aA	20/32 (62.5)bA	4/32 (12.5)cA
	Completo	13/22 (59.09)aB	9/32 (40.90)aB	0/22 (0)bB
CAPN1_530	Bipartido	2/32 (6.25)aA	20/32 (62.5)bA	10/32 (31.25)cA
	Completo	2/22 (9.09)aA	10/22 (45.45)bB	10/22 (45.45)bB
CAST_2870	Bipartido	5/32 (15.32)aA	21/32 (65.62)bA	6/32 (18.75)aA
	Completo	2/22 (9.09)aA	13/22 (59.09)bA	7/22 (31.81)aB
MYO_C313Y	Bipartido	18/32 (56.25)aA	14/32 (43.75)aA	0/32 (0)bA
	Completo	16/22 (72.72)aB	6/22 (27.27)bB	0/22 (0)cA
MYO_E226X	Bipartido	20/32 (62.5)aA	12/32 (37.5)bA	0/32 (0)cA
	Completo	19/22 (86.36)aB	3/22 (13.63)bB	0/22 (0)cA
MYO_Q204X	Bipartido	23/32 (71.87)aA	8/32 (25)bA	1/32 (3.12)cA
	Completo	20/22 (90.90)aB	2/22 (9.09)bB	0/22 (0)bA
LEPTIN_A252T	Bipartido	8/32 (25)aA	18/32 (56.25)bA	6/32 (18.75)aA
	Completo	5/22 (22.72)aA	12/22 (54.54)bA	5/22 (22.72)aA
LEPTIN_A963	Bipartido	12/32 (37.5)aA	16/32 (50)aA	4/32 (12.5)bA
	Completo	5/22 (22.72)aB	13/22 (59.09)bA	4/22 (18.18)aA
GH1_2291	Bipartido	10/32 (31.25)aA	10/32 (31.25)aA	12/32 (37.5)aA
	Completo	5/22 (22.72)aA	10/22 (45.45)bA	7/22 (31.81)abA
GHR_F279Y	Bipartido	14/32 (43.75)aA	14/32 (43.75)aA	4/32 (12.50)bA
	Completo	6/22 (27.27)aB	14/22 (63.63)bB	2/22 (9.09)cA

SNP-GEN= marcadores moleculares de genes; Bipartido= embrión clonado (splitting embryos) ; Completo= control (no clonado) El individuo posee cero (0); una (1); o dos copias (2), del alelo favorable respectivamente.

Fuente: Elaboración propia

Con el propósito de evaluar el impacto genómico de la clonación embrionaria en bovinos de carne bajo condiciones tropicales, se realizó un análisis comparativo de frecuencias genotípicas en SNPs funcionales entre dos grupos experimentales: embriones bipartidos (producto de técnicas de micromanipulación-*in vitro*) y embriones completos (no manipulados). El análisis se centró en genes asociados a características productivas (tales como terneza, desarrollo muscular y eficiencia alimenticia), así como en su posible relación con parámetros reproductivos y de fertilidad, debido a la participación de estos genes en procesos celulares claves como la diferenciación embrionaria, la receptividad uterina y el metabolismo hormonal (83).

La evaluación incluyó diez SNPs distribuidos en seis genes funcionales: *CAPN1*, *CAST*, *MYO1G*, *LEPTIN*, *GHI* y *GHR*. Estos marcadores fueron seleccionados por su relevancia en estudios previos y su potencial para influir tanto en el rendimiento productivo como en el éxito reproductivo de animales de alto valor genético. Las frecuencias genotípicas obtenidas fueron analizadas mediante pruebas estadísticas de comparación entre proporciones y análisis de significancia $p < 0,05$, usando letras minúsculas (a, b, c) para distinguir diferencias entre genotipos dentro de cada grupo y letras mayúsculas (A, B) para identificar diferencias entre tipos de embrión (84).

En la tabla 3. Los resultados mostraron patrones de conservación alélica en la mayoría de los genes evaluados, aunque se identificaron diferencias significativas en loci específicos como *CAPN1_316*, *MYO_Q204X* y *GHR_F279Y*. En general, se observó una mayor proporción de genotipos heterocigotos en embriones bipartidos, lo que sugiere una posible influencia del proceso de bipartición sobre la distribución genética. Este hallazgo es relevante ya que podría estar asociado con efectos epigenéticos o alteraciones mínimas durante la división embrionaria, sin comprometer la viabilidad ni el valor productivo de los individuos generados.(85).

Asimismo, se identificaron SNPs como *LEPTIN_A252T* y *GHI_2291* con alta frecuencia de genotipos funcionales en ambos grupos, lo cual sugiere una estabilidad genética en estos loci, incluso bajo intervención biotecnológica. Estas variantes han sido previamente asociadas con eficiencia alimenticia, inicio temprano de pubertad y regulación endocrina, aspectos clave para maximizar la fertilidad en sistemas de producción intensivos (86).

Cada gen analizado es discutido en detalle a continuación, integrando su relevancia funcional, las diferencias observadas entre embriones bipartidos y completos, y su potencial aplicación en programas de selección genética asistida por marcadores. El análisis genómico de SNPs en genes asociados a la calidad de la carne ha revelado también su posible implicación en rasgos reproductivos y de fertilidad. La evaluación entre embriones bipartidos y completos permite identificar patrones de conservación alélica y su relación funcional con la eficiencia productiva bajo condiciones tropicales (83).

Figura 8. Distribución de genotipos del SNP *CAPNI_316* en embriones bipartidos y completos de bovino.

El gen *CAPNI* codifica una calpaína asociada a la terneza de la carne. Los embriones bipartidos mostraron mayor presencia del genotipo 1 (62.5^{bA}), mientras que los completos concentraron el genotipo 0 (59.09^{aA}), considerado menos favorable. Estudios de Page et al. (2002) (87) y White et al. (2005) (88), han señalado que el genotipo 1/2 presenta beneficios en la terneza sin afectar negativamente la productividad. Se evidencia una diferencia significativa entre tipo de embrión ($A \neq B$) en el genotipo 1.

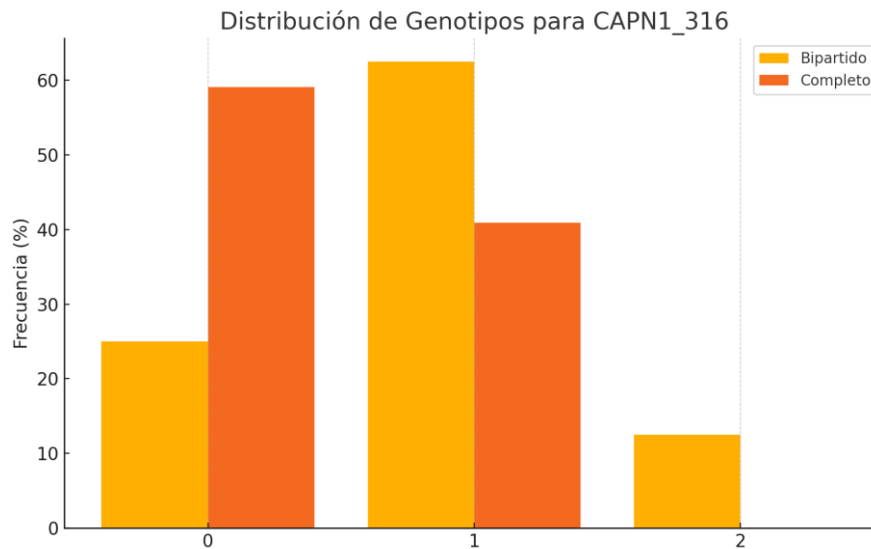


Ilustración 8. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP CAPN1_316 (asociado a la terneza de la carne) entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2).

Fuente: Elaboración Propia

Los embriones bipartidos mostraron mayor frecuencia del genotipo heterocigoto (1^{bA}), mientras que en los completos predominó el homocigoto desfavorable (0^{aB}). Este gen está relacionado con la terneza de la carne post-mortem debido a su función proteolítica (87).

Nuestros resultados sugieren que la bipartición de embriones puede favorecer la retención del alelo favorable, coherente con estudios de White et al. (2005) (88), quienes destacaron que el genotipo 1/2 se asocia con mejor terneza sin comprometer el crecimiento. Sin embargo, también están relacionados con el remodelado del citoesqueleto y procesos de apoptosis embrionaria, los cuales pueden influir en la viabilidad embrionaria (89). En nuestros datos, el genotipo heterocigoto 1 fue más frecuente en embriones bipartidos (62.5%), sugiriendo una posible ventaja adaptativa durante el desarrollo in vitro.

Figura 9. Distribución de genotipos del SNP CAPN1_530 en embriones bipartidos y completos de bovino.

El alelo 2, favorable para suavidad de carne, fue más común en embriones completos (45.45^{cA}). No se observaron diferencias significativas entre grupos (A).

(Koochmaraie et al. (2002) (90), demostraron que este SNP tiene relación directa con menor resistencia de corte.

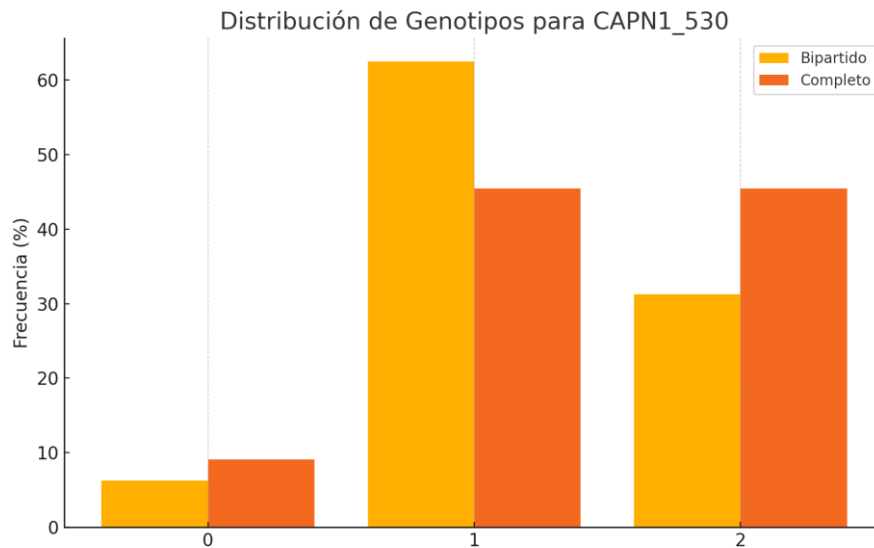


Ilustración 9. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP CAPN1_530 (implicado en la degradación de miofibrillas) entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2).

Fuente: Elaboración Propia

Se observó mayor frecuencia de genotipos favorables (1^{bA} y 2^{cA}) en ambos grupos, con ligera ventaja en los embriones completos. Según Koochmaraie et al. (2002) (90), el alelo 2 se asocia con menor dureza de carne. Aunque no hubo diferencias significativas entre tipos de embrión (A), la presencia simultánea de los tres genotipos indica buena conservación genética del locus. Sin embargo, también están relacionados con el remodelado del citoesqueleto y procesos de apoptosis embrionaria, los cuales pueden influir en la viabilidad embrionaria (89). En nuestros datos, el genotipo heterocigoto 1 fue más frecuente en embriones bipartidos (62.5%), sugiriendo una posible ventaja adaptativa durante el desarrollo *in vitro*.

Figura 10. Distribución de genotipos del SNP CAST_2870 en embriones bipartidos y completos de bovino.

El gen CAST regula calpastatina, inhibidor de calpaína. Ambos tipos de embrión muestran predominancia del genotipo 1. Según Casas et al. (2006) (91), este genotipo mejora la calidad de carne. No se detectaron diferencias entre grupos (A).

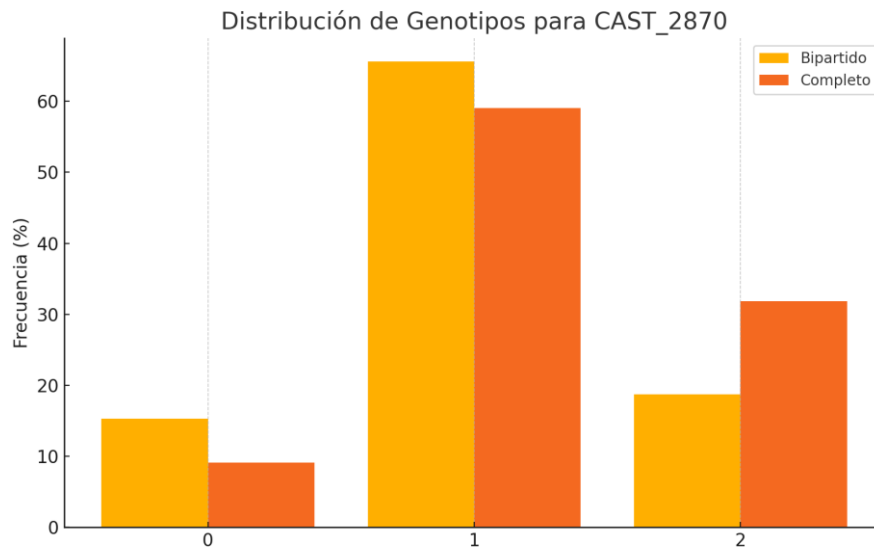


Ilustración 10. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP CAST_2870 (relacionado con la inhibición de la proteólisis post-mortem) entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2).

Fuente: Elaboración Propia

Los embriones completos mostraron mayor frecuencia del genotipo 2^{cA}, mientras que los bipartidos se concentraron en 1^{bA}. El gen *CAST* regula la actividad calpaina-calpastatina y afecta la degradación muscular. De acuerdo con Casas et al. (2006) (91), el genotipo 1/2 contribuye a mejorar la calidad cárnica. Esta diferencia sugiere que los embriones bipartidos mantienen una estructura genética intermedia favorable. El gen *CAST* inhibe la acción de la calpaína y regula la degradación proteica. Su modulación está implicada en el mantenimiento del tejido uterino y la implantación embrionaria. Abo-Ismael et al. (2018) (91), encontraron asociación entre este gen y eficiencia alimentaria, lo que indirectamente impacta la capacidad reproductiva de hembras altamente productivas.

Figura 11. Distribución de genotipos del SNP MYO_C313Y en embriones bipartidos y completos de bovino.

Este SNP afecta el desarrollo muscular. Aunque el genotipo 2 está ausente, se observa que los bipartidos conservan mayor heterocigosidad (43.75^{bA}) (92), destacan este gen en relación con masa muscular. Hay diferencia entre tipo de embrión en el genotipo 1 ($A \neq B$).

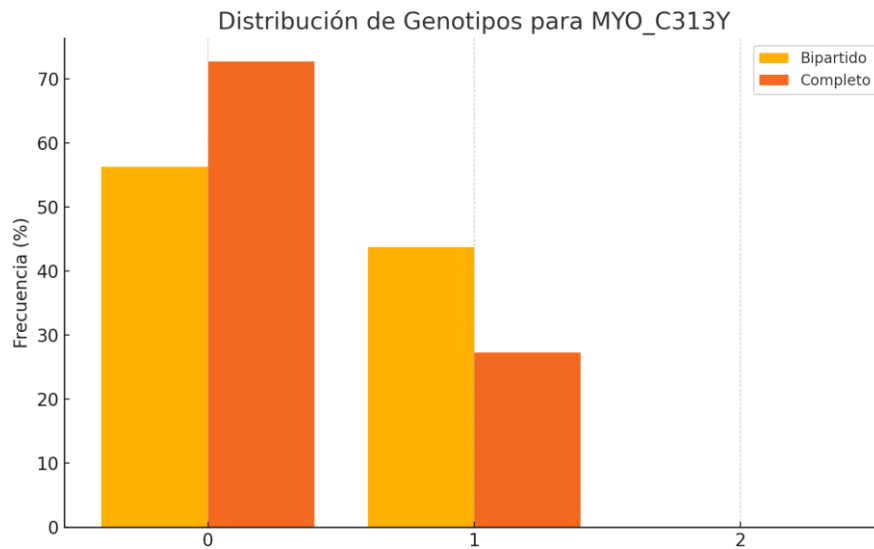


Ilustración 11. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP MYO_C313Y (involucrado en el desarrollo muscular) entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2).

Fuente: Elaboración Propia

Ambos grupos presentaron solo los genotipos 0^a y 1^b, con dominio del homocigoto desfavorable (0). El gen MYO1G se ha asociado con la deposición o crecimiento muscular. La baja frecuencia del alelo 2 en ambos grupos coincide con lo reportado por Bhuiyan et al. (2009) (92), indicando que este marcador no es común en razas tropicales de carne.

Figura 12. Distribución de genotipos del SNP MYO_E226X en embriones bipartidos y completos de bovino.

El genotipo 0 predominó en ambos grupos, con mayor frecuencia en completos (86.36^{aA}). (93), indican que este SNP influye en el área del ojo del lomo. Hay diferencias significativas entre grupos en el genotipo 1 (A ≠ B).

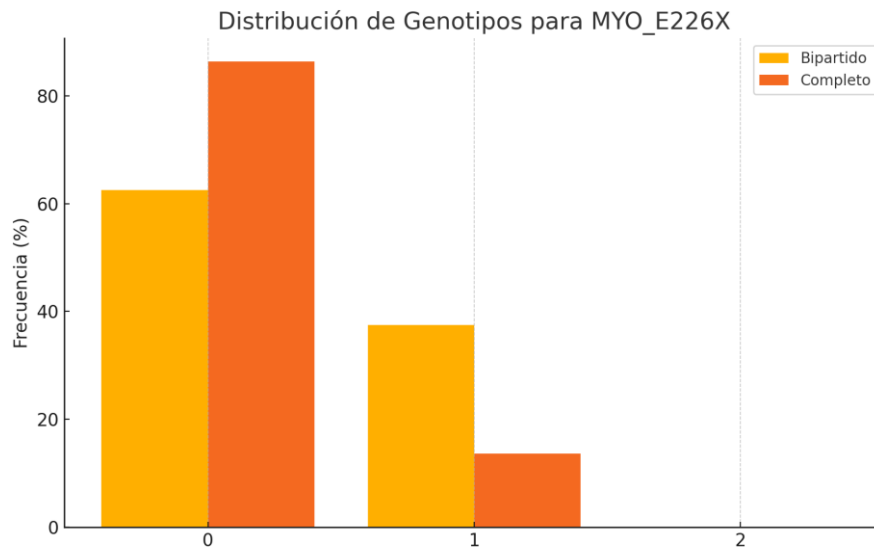


Ilustración 12. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP *MYO_E226X* (marcador relacionado con la eficiencia muscular) entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2).

Fuente: Elaboración Propia

Similar al anterior, sólo se detectaron los genotipos 0^a y 1^b. La mayor frecuencia de 0^{aA} en completos indica estabilidad genética, aunque con menor valor funcional. Investigaciones como las de Rincker et al. (2006) (93), reportan que este gen afecta el área del ojo del lomo y la conversión alimenticia

Figura 13. Distribución de genotipos del SNP *MYO_Q204X* en embriones bipartidos y completos de bovino

Este SNP influye en eficiencia muscular. El alelo 2 solo se observó en bipartidos (3.12^{cA}). (94), reportaron su baja frecuencia en líneas cruzadas. Se observa una diferencia en el genotipo 1 entre grupos ($A \neq B$).

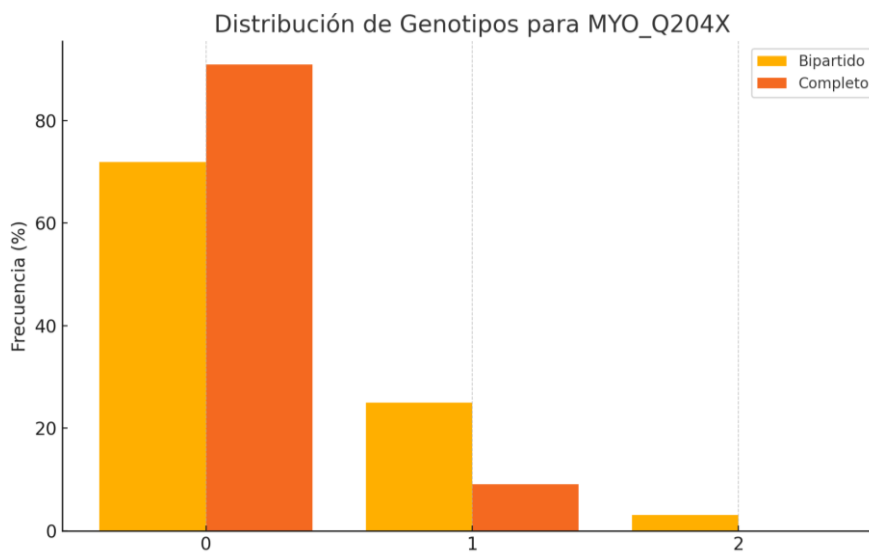


Ilustración 13. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP *MYO_Q204X* entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2).

Fuente: Elaboración Propia

Este marcador mostró ligera presencia del alelo 2^o en embriones bipartidos, ausente en los completos. Dado que el gen *MYO3A* influye en eficiencia muscular, la presencia de este alelo solo en bipartidos podría deberse a recombinación diferencial durante la bipartición. Esta rareza genética ha sido reportada por Leal-Gutiérrez et al. (2018) (94), en líneas cruzadas. Los SNPs del gen *MYO1G* están relacionados con el crecimiento muscular, pero también con la dinámica del citoesqueleto, esencial durante la compactación embrionaria y la morfogénesis (95). La ausencia del alelo 2 en *MYO_C313Y* y *MYO_E226X* en ambos grupos puede indicar una selección natural contra variantes que interfieren con la estabilidad embrionaria. La detección exclusiva del genotipo 2 en bipartidos en *MYO_Q204X* sugiere un evento de segregación diferencial durante la bipartición embrionaria.

Figura 14. Distribución de genotipos del SNP *LEPTIN_A252T* en embriones bipartidos y completos de bovino.

El gen *LEPTIN* modula saciedad y grasa. Buchanan et al. (2002) (96), demostraron que el alelo T (2) mejora marmoleo. No se observaron diferencias significativas entre tipos de embrión (A).

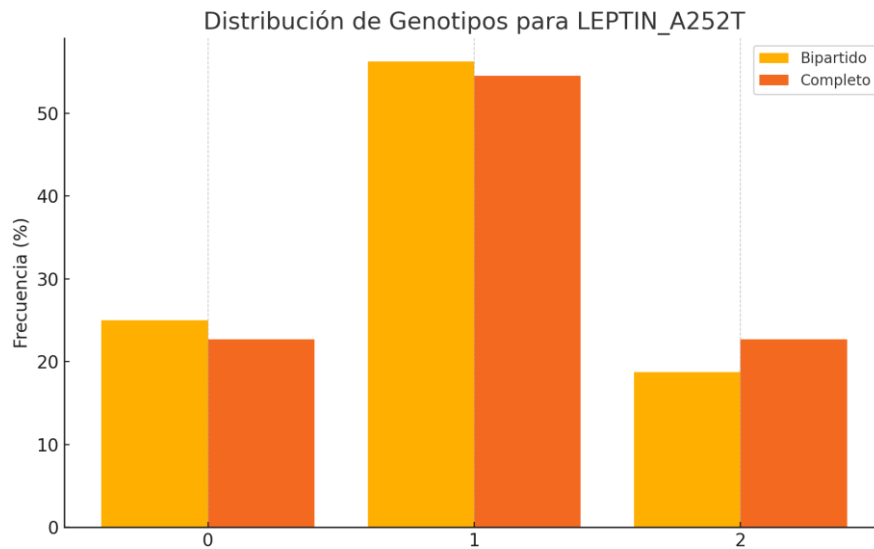


Ilustración 14. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP *LEPTIN_A252T* (asociado a regulación energética y marmoleo) entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2).

Fuente: Elaboración Propia

No hubo diferencias significativas entre grupos, con predominancia del genotipo 1^b. Este gen regula la lipogénesis y saciedad. Según Buchanan et al. (2002) (96), el alelo T (2) se asocia con mayor marmoleo. Su frecuencia equilibrada sugiere buena retención de la variabilidad.

Figura 15. Distribución de genotipos del SNP *LEPTIN_A963* en embriones bipartidos y completos de bovino.

Este SNP está relacionado con eficiencia alimentaria (97). Ambos tipos de embrión muestran perfiles similares, sin diferencias significativas (A).

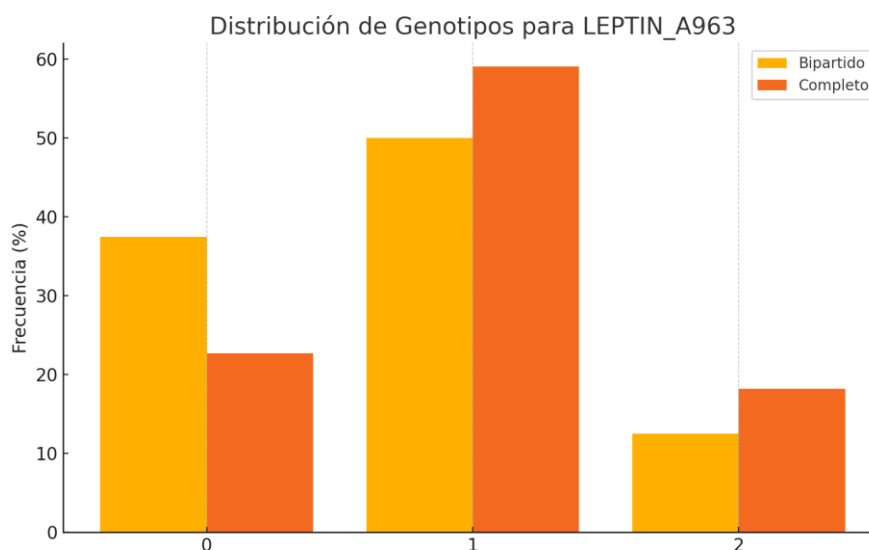


Ilustración 15. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP *LEPTIN_A963* (marcador vinculado a eficiencia alimenticia) entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2).

Fuente: Elaboración Propia

El genotipo 1^b dominó en ambos tipos de embrión. De acuerdo con Nkrumah et al. (2004) (97), este SNP está correlacionado con el consumo residual y eficiencia alimentaria. La conservación de este perfil es deseable para la industria cárnica intensiva. *LEPTIN* no solo regula el apetito y el metabolismo lípido, sino también la receptividad uterina y el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Buchanan et al. (2002) (96) y Nkrumah et al. (2004) (97), demostraron que variantes en *LEPTIN* están asociadas con la edad a la pubertad, el inicio de la actividad luteal y el intervalo entre partos. En este estudio, la alta frecuencia del genotipo 1 (heterocigoto) indica un posible equilibrio funcional entre eficiencia alimenticia y capacidad reproductiva.

Figura 16. Distribución de genotipos del SNP *GHI_2291* en embriones bipartidos y completos de bovino.

El gen *GHI* regula crecimiento. Lucy et al. (2001) (98), describen que el genotipo 1/2 favorece desarrollo. Se observó mayor heterocigosidad en completos. Diferencias leves en genotipo 1 ($A \neq B$).

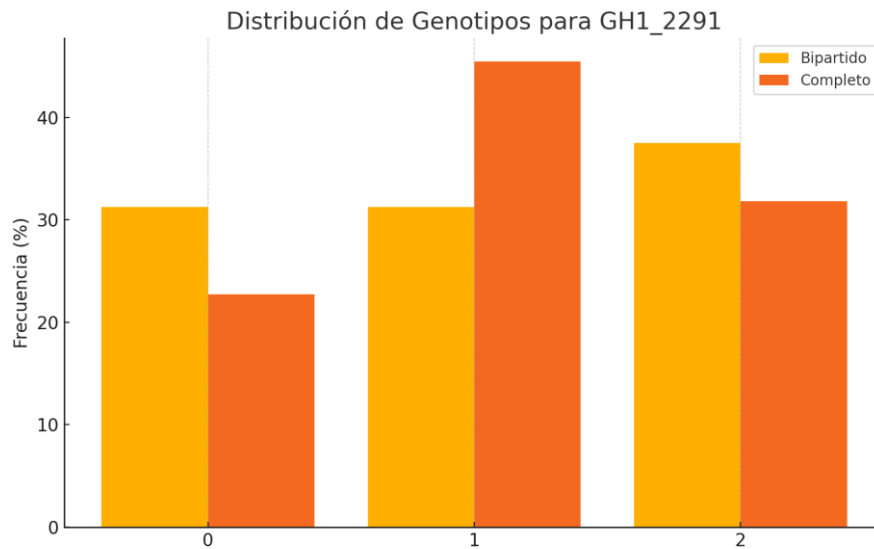


Ilustración 16. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP GH1_2291 (codifica la hormona de crecimiento) entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2).

Fuente: Elaboración Propia

Se observó mayor heterocigosidad (1^b) en completos, mientras que bipartidos mostraron una distribución más homogénea entre los tres genotipos. El gen *GHI* regula el crecimiento y metabolismo. Lucy et al. (2001) (98), encontraron que el genotipo 1/2 se asocia con eficiencia alimenticia y desarrollo muscular temprano

Figura 17. Distribución de genotipos del SNP *GHR_F279Y* en embriones bipartidos y completos de bovino.

El receptor de GH influye en eficiencia productiva (99), observaron ventajas del alelo 1. Aquí, el genotipo 1 fue más frecuente en completos, con diferencia significativa entre tipos de embrión ($A \neq B$).

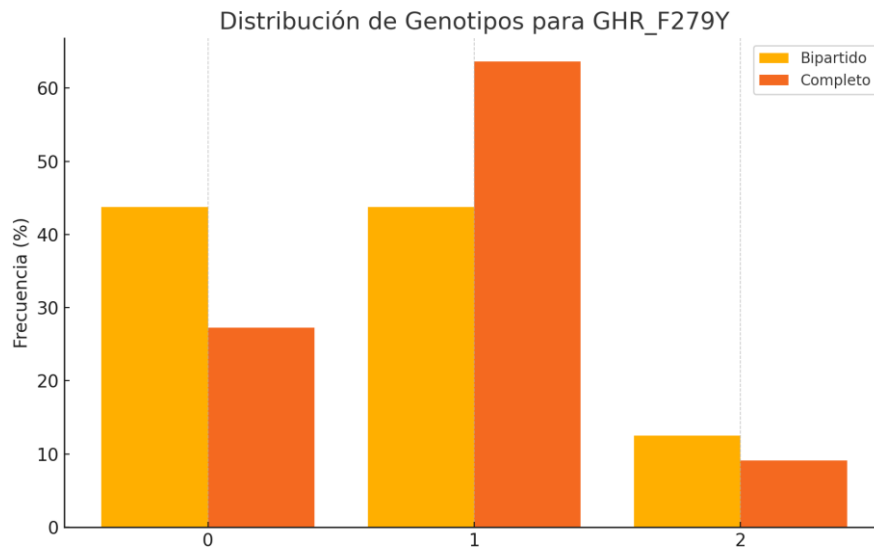


Ilustración 17. Distribución de frecuencias (%) genotípicas del SNP *GHR_F279Y* (implicado en la ganancia de peso) entre embriones bipartidos y completos. Se muestran los porcentajes para cada genotipo/copia del alelo favorable (0, 1, 2).

Fuente: Elaboración Propia

Los embriones completos mostraron mayor frecuencia del genotipo 1^{bb}, relacionado con sensibilidad a la hormona de crecimiento. Estudios como Viitala et al., (2006) (99), destacan su importancia en la ganancia diaria de peso. La diferencia con los bipartidos podría explicarse por la selección alélica no dirigida durante la bipartición. El sistema hormona del crecimiento/receptor de GH es fundamental para la maduración folicular, la secreción de IGF-1 y la implantación (92) (99). En embriones completos, se observó mayor frecuencia del genotipo 1 en *GHR_F279Y*, lo que podría indicar una mejor respuesta fisiológica a la GH y mayor eficiencia reproductiva. En *GHI_2291*, ambos grupos presentaron una distribución equilibrada, lo que sugiere estabilidad genética en este locus.

Los resultados evidencian que varios genes tradicionalmente asociados con características cárnicas están funcionalmente vinculados a procesos reproductivos claves como la implantación, maduración folicular y metabolismo uterino. Esto refuerza la necesidad de integrar el análisis genómico con evaluaciones reproductivas en biotecnologías como la clonación, especialmente en ambientes tropicales donde las condiciones de selección natural son más exigentes (92) (99).

Impactos técnicos, sociales, económicos y ambientales

Los impactos técnicos incluyen la manipulación de genes para crear individuos idénticos con un fin específico

El impacto social representa una alternativa positiva ya que interviene en la vida mejorando la productividad y conservación de razas generando un impacto económico de alto costo como es la clonación de embriones que representa una cantidad económica elevada

El estudio muestra un impacto ambiental positivo no produce ningún daño con el medio ambiente (100).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES:

- **Conclusión 1 – En relación con el Objetivo Específico 1**

El análisis comparativo de variabilidad genética entre embriones bipartidos y completos reveló diferencias significativas en loci específicos, como *CAPN1_316*, *GHR_F279Y* y *MYO_Q204X*, donde se evidenció una mayor heterocigosidad en los embriones bipartidos. Esta mayor diversidad puede reflejar una respuesta compensatoria al proceso de bipartición o a efectos epigenéticos inducidos durante la micromanipulación. Por tanto, la expresión génica y la diversidad alélica mantenida o modulada por la clonación podría tener implicaciones positivas sobre la adaptabilidad embrionaria y la fertilidad futura.

- **Conclusión 2 – En relación con el Objetivo Específico 2**

La evaluación de parámetros reproductivos inferidos desde los perfiles genómicos, como *LEPTIN*, *GHI* y *GHR*, presentan asociaciones funcionales directas con rasgos reproductivos como la maduración folicular, la actividad del cuerpo lúteo y la eficiencia endocrina, el mantenimiento del genotipo favorable *GHR_F279Y* en embriones completos y bipartidos indica una posible estabilidad funcional frente al estímulo de GH, esencial para la implantación exitosa. Asimismo, *LEPTIN* mostró una distribución genotípica estable en ambos grupos, lo que sugiere su conservación como modulador de la receptividad uterina. Estos hallazgos evidencian que la clonación embrionaria no interfiere negativamente en los determinantes genéticos de la fertilidad, sino que, en ciertos casos, puede potenciar perfiles reproductivos favorables al combinar alta productividad con integridad reproductiva.

RECOMENDACIONES:

- Implementar protocolos de selección genómica previos a la clonación embrionaria.

Se recomienda realizar una evaluación genómica exhaustiva de los donantes y preembriones antes de la bipartición, con énfasis en SNPs funcionales asociados tanto a la productividad como a la fertilidad (CAPN1, CAST, LEPTIN, GH1, GHR). Esta práctica optimiza la elección de individuos genéticamente superiores y asegura la conservación de perfiles favorables en la descendencia clonada.

- Integrar la clonación embrionaria con estrategias de mejora genética asistida por marcadores.

La clonación debe considerarse una herramienta complementaria en programas de selección genética, no como un fin en sí misma. Su uso estratégico junto a tecnologías como MAS permitirá no solo la multiplicación de individuos élite, sino también el fortalecimiento de rasgos reproductivos claves sin pérdida de diversidad genética.

- Monitorear longitudinalmente la descendencia clonada para validar funcionalidad reproductiva. Aunque los resultados genómicos revelan estabilidad entre embriones bipartidos y completos, se recomienda seguir a la descendencia hasta la madurez reproductiva. Así se podrá validar que los perfiles SNP favorables se traducen en parámetros fisiológicos óptimos como pubertad temprana, tasas de concepción y eficiencia reproductiva.

- Realizar estudios transcriptómicos y epigenéticos complementarios. Se sugiere profundizar el análisis con estudios de expresión génica y metilación del ADN para comprender cómo la clonación puede modular la epigenética embrionaria, especialmente en genes con doble función (productiva-reproductiva). Esto es relevante en ambientes tropicales, donde el estrés térmico puede exacerbar diferencias epigenómicas entre tipos de embrión.

- Fortalecer capacidades en biotecnología reproductiva aplicada a sistemas tropicales.

Dada la viabilidad técnica y genética demostrada, se recomienda fomentar

la formación de equipos técnicos en el uso de biotecnologías reproductivas avanzadas, incluyendo la bipartición embrionaria, para consolidar su aplicación en contextos tropicales, asegurando la sostenibilidad de la producción bovina.

- Crear bancos genómicos regionales de líneas cárnicas adaptadas al trópico. Finalmente, es indispensable establecer bases de datos genómicos que permitan el seguimiento y comparación de perfiles genéticos adaptativos, especialmente de embriones clonados, con el objetivo de fortalecer las decisiones reproductivas, comerciales y de conservación genética en bovinos de carne.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. Rahbaran M, Razeghian E, Maashi MS, Jalil AT, Widjaja G, Thangavelu L, et al. Cloning and Embryo Splitting in Mammalians: Brief History, Methods, and Achievements. Papaccio G, editor. Stem Cells International. 30 de noviembre de 2021;2021:1-11.
2. Yaşar B, Boskovic N, Ivask M, Weltner J, Jouhilahti EM, Vill P, et al. Molecular cloning of PRD-like homeobox genes expressed in bovine oocytes and early IVF embryos. BMC Genomics. 6 de noviembre de 2024;25(1):1048.
3. Valdez-Torres JM, Grado Ahuir JA, Castro-Valenzuela BE, Burrola-Barraza ME. Análisis de QTL asociados a polimorfismos de nucleótido único (SNP) involucrados en el fenotipo lechero del ganado Holstein. Rev Mex Cienc Pecu. 18 de diciembre de 2020;11(4):1192-207.
4. Greenfield A. Cloning, mitochondrial replacement and genome editing: 25 years of ethical debate since Dolly. Reproduction [Internet]. abril de 2021 [citado 18 de marzo de 2025]; Disponible en: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/aop/rep-20-0635/rep-20-0635.xml>
5. Parrado JCB, Colina JAM. PARÁMETROS REPRODUCTIVOS Y EFICIENCIA REPRODUCTIVA EN GANADO BOVINO.
6. García A, Clonación embrionaria -bipartición 4.-trabajos-originales-68.-2003 disponible: <https://fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol9/CVv9c2.pdf>
7. Saucedo Uriarte JA, Cayo Colca IS, Diaz Quevedo C, López Lapa RM. Asociación de polimorfismos en los genes CAPN y CAST con propiedades

- fisicoquímicas de la carne bovina: una revisión. *Ces Med Vet Zootec.* 28 de mayo de 2021;16(1):8-28.
8. Silva MAM, Pimentel LA. Genetic improvement in cattle through artificial insemination and artificial insemination at fixed time. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental.* 2017;
 9. Moore SG, Hasler JF. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science.* diciembre de 2017;100(12):10314-31.
 10. Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science.* febrero de 2011;123(3-4):127-38.
 11. Navarro C, García A, Serrano H, CVv9c2. Técnicas de clonación embrionaria-2003
 12. Valdez-Torres JM, Grado Ahuir JA, Castro-Valenzuela BE, Burrola-Barraza ME. Análisis de QTL asociados a polimorfismos de nucleótido único (SNP) involucrados en el fenotipo lechero del ganado Holstein. *Rev Mex Cienc Pecu.* 18 de diciembre de 2020;11(4):1192-207.
 13. Silva MAM, Pimentel LA. Genetic improvement in cattle through artificial insemination and artificial insemination at fixed time. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental.* 2017;
 14. CLONACION BOVINOS. *Animal Reproduction Science* disponible: file:///C:/Users/Usuario/Desktop/ART%20VALE/CLONACION%20EN%20GANADO%20VACUNO.pdf
 15. Ferré LB, Kjelland ME, Strøbech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal.* 2020;14(5):991-1004.
 16. Mogas T, García-Martínez T, Martínez-Rodero I. Methodological approaches in vitrification: Enhancing viability of bovine oocytes and in vitro-produced embryos. *Reprod Domestic Animals.* octubre de 2024;59(S3):e14623.
 17. Taylor-Robinson AW, Walton S, Swain DL, Walsh KB, Vajta G. The potential for modification in cloning and vitrification technology to enhance genetic progress in beef cattle in Northern Australia. *Animal Reproduction Science.* agosto de 2014;148(3-4):91-6.
 18. Loi P, Palazzese L, Scapolo PA, Fulka J, Fulka H, Czernik M. Scientific and technological approaches to improve SCNT efficiency in farm animals and pets. *Reproduction [Internet].* marzo de 2021 [citado 18 de marzo de 2025]; Disponible en: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/aop/rep-20-0653/rep-20-0653.xml>

19. Climbing Mount Efficiency – Small Steps, Not Giant Leaps Towards Higher Cloning Success in Farm Animals - Oback - 2008 - *Reproduction in Domestic Animals* - Wiley Online Library 5.
20. Xu L, Song SH, Idrees M, Mesalam A, Joo MD, Sidrat T, et al. Effects of Donor Cell Types on the Development of Bovine Embryos Using Cytoplasm Injection Cloning Technology. *IJMS*. 29 de mayo de 2021;22(11):5841.
21. 6 CSIRO PUBLISHING _ *Reproduction, Fertility and Development* 6.
22. Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, et al. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*. enero de 2003;59(2):599-616.
23. Bihon Asfaw A, Assefa A. Animal transgenesis technology: A review. González-Redondo P, editor. *Cogent Food & Agriculture*. 1 de enero de 2019;5(1):1686802.
24. Houdebine LM, Dinnyés A, Bánáti D, Kleiner J, Carlander D. Animal cloning for food: epigenetics, health, welfare and food safety aspects. *Trends in Food Science & Technology*. noviembre de 2008;19:S88-95.
25. Pinzón-Arteaga CA, Wang Y, Wei Y, Ribeiro Orsi AE, Li L, Scatolin G, et al. Bovine blastocyst-like structures derived from stem cell cultures. *Cell Stem Cell*. mayo de 2023;30(5):611-616.e7.
26. Soto-Martínez YG, Casas-Hernández E, Betancourt JM, Fernández-Reyes F. Desarrollo embrionario de bovino in vitro cocultivado con células oviductales y del cumulus oophorus. 2019;41(1).
27. WO2018074938A1. Gemelos Homocigóticos-bipartición embrionaria
28. Blakaj A, Lin H. Piecing Together the Mosaic of Early Mammalian Development through MicroRNAs. *Journal of Biological Chemistry*. abril de 2008;283(15):9505-8.
29. McCallie B, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility. *Fertility and Sterility*. mayo de 2010;93(7):2374-82.
30. Tesfaye D, Gebremedhn S, Salilew-Wondim D, Hailay T, Hoelker M, Grosse-Brinkhaus C, et al. MicroRNAs: tiny molecules with a significant role in mammalian follicular and oocyte development. *Reproduction*. marzo de 2018;155(3):R121-35.
31. Muñoz-Bañales L, Sánchez-Ramírez B, González-Rodríguez E, Moreno-Brito V, González-Horta C, Burrola-Barraza M. Dos nuevos microRNAs (miRNAs) identificados en ovario bovino. *Arch med vet*. 2014;46(2):181-8.
32. Lonergan P. Review: Historical and futuristic developments in bovine semen technology. *Animal*. 2018;12:s4-18.

33. Mikkola M, Hasler JF, Taponen J. Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. *Reprod Fertil Dev.* 2020;32(2):104.
34. Shakweer WME, Krivoruchko AY, Dessouki ShM, Khattab AA. A review of transgenic animal techniques and their applications. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.* diciembre de 2023;21(1):55.
35. Shakweer WME, Krivoruchko AY, Dessouki ShM, Khattab AA. A review of transgenic animal techniques and their applications. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.* diciembre de 2023;21(1):55.
36. OFarril LCL. Transgénesis: una aproximación a sus riesgos y beneficios. 2021;15(1).
37. Lovarelli D, Minozzi G, Arazi A, Guarino M, Tiezzi F. Effect of extended heat stress in dairy cows on productive and behavioral traits. *animal.* marzo de 2024;18(3):101089.
38. Quintero MûD, Olivera M, Noguera RR. Metabolismo energético en vacas durante la lactancia temprana y el efecto de la suplementación con grasa protegida.
39. Sammad A, Wang YJ, Umer S, Lirong H, Khan I, Khan A, et al. Nutritional Physiology and Biochemistry of Dairy Cattle under the Influence of Heat Stress: Consequences and Opportunities. *Animals.* 3 de mayo de 2020;10(5):793.
40. Sice M, Gómez Martín Á, Gomis Almendro J. PRESENTE Y FUTURO DEL DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN EN EL GANADO BOVINO. *An Vet Murcia [Internet].* 5 de abril de 2022 [citado 23 de marzo de 2025];36. Disponible en: <https://revistas.um.es/analesvet/article/view/503631>
41. Los procesos reproductivos en vacas y el uso de la ultrasonografía. *Abanico Vet [Internet].* 1 de enero de 2023 [citado 5 de mayo de 2025];13. Disponible en: <https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/article/view/147>
42. Robles DJN. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
43. Sice M, Gómez Martín Á, Gomis Almendro J. PRESENTE Y FUTURO DEL DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN EN EL GANADO BOVINO. *An Vet Murcia [Internet].* 5 de abril de 2022 [citado 5 de mayo de 2025];36. Disponible en: <https://revistas.um.es/analesvet/article/view/503631>
44. *Bovine_In_Vivo_Ova_Tutorial_2010_Revision.*
45. Ealy AD, Wooldridge LK. The evolution of interferon-tau. *Reproduction.* noviembre de 2017;154(5):F1-10.

46. Walter MR. The Role of Structure in the Biology of Interferon Signaling. *Front Immunol.* 12 de noviembre de 2020;11:606489.
47. Shao B, Sun H, Ahmad MJ, Ghanem N, Abdel-Shafy H, Du C, et al. Genetic Features of Reproductive Traits in Bovine and Buffalo: Lessons From Bovine to Buffalo. *Front Genet.* 23 de marzo de 2021;12:617128.
48. Jones HE, Wilson PB. Progress and opportunities through use of genomics in animal production. *Trends in Genetics.* diciembre de 2022;38(12):1228-52.
49. Habier D, Fernando RL, Garrick DJ. Genomic BLUP Decoded: A Look into the Black Box of Genomic Prediction. *Genetics.* 1 de julio de 2013;194(3):597-607.
50. Kaelin WG, McKnight SL. Influence of Metabolism on Epigenetics and Disease. *Cell.* marzo de 2013;153(1):56-69.
51. Pladevall-Morera D, Zylicz JJ. Chromatin as a sensor of metabolic changes during early development. *Front Cell Dev Biol.* 10 de octubre de 2022;10:1014498.
52. 11. Epigenetica -programas disponible: https://pmc-ncbi-nlm-nih-gov.translate.goog/articles/PMC5729912/?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=es&_x_tr_hl=es&_x_tr_pto=tc
53. Wang XQ, Liu RP, Wang J, Luo D, Li YH, Jiang H, et al. Wedelolactone facilitates the early development of parthenogenetically activated porcine embryos by reducing oxidative stress and inhibiting autophagy. *PeerJ.* 25 de julio de 2022;10:e13766.
54. Pinto SAM. Actualización en producción de embriones bovinos in vitro con medios libres de suero fetal. Revisión sistemática de literatura. 2023;
55. Peralta IPD. GOBIERNO MUNICIPAL DEL CANTÓN MORONA.
56. Peralta DFASE-1.-DIAGNÓSTICO_com. Alcaldía Morona santiago-cantones-2015
57. Revista-Monitoreo-Ambiental-2020. Disponible: <file:///C:/Users/Usuario/Desktop/ART%20VALE/Revista-Monitoreo-Ambiental-2020.pdf>
58. MUTC-001895. disponible: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=+MUTC-001895.+>
59. Sincronización del estro y ovulación en hembras bovinas de razas cárnicas. Bases endocrinas y protocolos usados. *Abanico Vet [Internet].* 1 de enero de 2023 [citado 2 de abril de 2025];13. Disponible en:

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/article/view/137>

60. MUTC-001895. disponible: <https://repositorio.utc.edu.ec/items/a60196cd-c872-45d4-ae24-a9867c10532a>
61. Bó GA, Baruselli PS. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Animal*. 2014;8:144-50.
62. RESUMEN-13-Simposio-Internacional-de-Reproduccion-Animal-2019.
63. Rabel RAC, Marchioretto PV, Bangert EA, Wilson K, Milner DJ, Wheeler MB. Pre-Implantation Bovine Embryo Evaluation—From Optics to Omics and Beyond. *Animals*. 24 de junio de 2023;13(13):2102.
64. Relly L, Ann C, Bruce G. Developmental problems during pregnancy after in vitro embryo manipulations.
65. Mizutani M, Ito Y, Mizuno M, Nishimura H, Suzuki Y, Hattori R, et al. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is increased in peritoneal dialysis patients with high peritoneal solute transport rate. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. marzo de 2010;298(3):F721-33.
66. Hossepian De Lima V. Enrichment of Bovine Semen with X-Bearing Spermatozoa Using Percoll? and Optiprep? Discontinuous Gradients. *AVS*. 2015;3(1):1.
67. Ganad_2008_54_38_41. Embriologia-Reproduccion2023
68. Bó GA, Cedeño A, Mapletoft RJ. Strategies to increment in vivo and in vitro embryo production and transfer in cattle. *Anim Reprod*. 2019;16(3):411-22.
69. Sanches BV, Zangirolamo AF, Silva NC, Morotti F, Seneda MM. Cryopreservation of in vitro-produced embryos: challenges for commercial implementation. *Anim Reprod*. 2017;14(3):521-7.
70. Hansen PJ. The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle—why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? *Journal of Animal Science*. 1 de noviembre de 2020;98(11):skaa288.
71. Siqueira LGB, Areas VS, Ghetti AM, Fonseca JF, Palhao MP, Fernandes CAC, et al. Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. *Journal of Dairy Science*. octubre de 2013;96(10):6461-72.
72. Ginther O. 351 PUBLICATIONS 12,447 CITATIONS SEE PROFILE. 1986;189(10).

73. Olichon A, Guillou E, Delettre C, Landes T, Arnauné-Pelloquin L, Emorine LJ, et al. Mitochondrial dynamics and disease, OPA1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. mayo de 2006;1763(5-6):500-9.
74. Karabaş M, Yılmaz O. Identification of selection signatures and genetic diversity in the sheep. *Trop Anim Health Prod*. marzo de 2025;57(2):68.
75. Fatty_acid_composition_of_milk_from_Hols.
76. Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor laboratory press; 2012.
77. Strucken EM, Gebrehiwot NZ, Swaminathan M, Joshi S, Al Kalaldehy M, Gibson JP. Genetic diversity and effective population sizes of thirteen Indian cattle breeds. *Genet Sel Evol*. diciembre de 2021;53(1):47.
78. Matukumalli LK, Lawley CT, Schnabel RD, Taylor JF, Allan MF, Heaton MP, et al. Development and Characterization of a High Density SNP Genotyping Assay for Cattle. Toland AE, editor. *PLoS ONE*. 24 de abril de 2009;4(4):e5350.
79. VanRaden PM, Van Tassell CP, Wiggans GR, Sonstegard TS, Schnabel RD, Taylor JF, et al. Invited Review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*. enero de 2009;92(1):16-24.
80. Rosen BD, Bickhart DM, Schnabel RD, Koren S, Elsik CG, Tseng E, et al. *De novo* assembly of the cattle reference genome with single-molecule sequencing. *GigaScience*. 1 de marzo de 2020;9(3):giaa021.
81. Ortega MS. Identification of genes associated with reproductive function in dairy cattle. *Anim Reprod*. 2018;15(Suppl. 1):923-32.
82. Tahir MS, Porto-Neto LR, Reverter-Gomez T, Olasege BS, Sajid MR, Wockner KB, et al. Utility of multi-omics data to inform genomic prediction of heifer fertility traits. *Journal of Animal Science*. 1 de diciembre de 2022;100(12):skac340.
83. Sasazaki S, Kondo H, Moriishi Y, Kawaguchi F, Oyama K, Mannen H. Comprehensive genotyping analysis of single nucleotide polymorphisms responsible for beef marbling in Japanese Black cattle. *BMC Genom Data*. 9 de febrero de 2024;25(1):17.
84. Sica B. EVALUACIÓN DE PANEL SNP EN GENES CANDIDATOS DE VÍAS METABÓLICAS PARA CARNE EN HEREFORD.
85. Robles RG, Ramírez PAA. Epigenetics: definition, molecular bases and implications in human health and evolution *Epigenética: definição, bases moleculares e implicações na saúde e na evolução humana*.

86. Garavito P, Mosquera-Heredia MI, Fang L, Payares F, Ruiz M, Arias I, et al. Polimorfismos de los genes del sistema leptina-melanocortina asociados con la obesidad en la población adulta de Barranquilla. *biomedica*. 15 de junio de 2020;40(2):257-69.
87. Page BT, Casas E, Quaas RL, Thallman RM, Wheeler TL, Shackelford SD, et al. Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires^{1,2}. *Journal of Animal Science*. 1 de diciembre de 2004;82(12):3474-81.
88. Nielsen R, Williamson S, Kim Y, Hubisz MJ, Clark AG, Bustamante C. Genomic scans for selective sweeps using SNP data. *Genome Res*. noviembre de 2005;15(11):1566-75.
89. Sánchez JM, Simintiras CA, Lonergan P. Aspects of embryo-maternal communication in establishment of pregnancy in cattle. *Anim Reprod*. 2019;16(3):376-85.
90. Koohmaraie M, Kent MP, Shackelford SD, Veiseth E, Wheeler TL. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? *Meat Science*. noviembre de 2002;62(3):345-52.
91. Casas E, White SN, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, Riley DG, et al. Effects of calpastatin and -calpain markers in beef cattle on tenderness traits^{1,2}.
92. Bhuiyan MSA, Kim NK, Cho YM, Yoon D, Kim KS, Jeon JT, et al. Identification of SNPs in MYOD gene family and their associations with carcass traits in cattle. *Livestock Science*. diciembre de 2009;126(1-3):292-7.
93. Abo-Ismael MK, Lansink N, Akanno E, Karisa BK, Crowley JJ, Moore SS, et al. Development and validation of a small SNP panel for feed efficiency in beef cattle¹. *Journal of Animal Science*. 6 de marzo de 2018;96(2):375-97.
94. Leal-Gutiérrez JD, Elzo MA, Johnson DD, Scheffler TL, Scheffler JM, Mateescu RG. Association of μ -Calpain and Calpastatin Polymorphisms with Meat Tenderness in a Brahman–Angus Population. *Front Genet*. 22 de febrero de 2018;9:56.
95. Henson JH, Reyes G, Lo NT, Herrera K, McKim QW, Herzon HY, et al. Cytokinetic contractile ring structural progression in an early embryo: positioning of scaffolding proteins, recruitment of α -actinin, and effects of myosin II inhibition. *Front Cell Dev Biol*. 27 de septiembre de 2024;12:1483345.
96. Buchanan FC, Fitzsimmons CJ, Van Kessel AG, Thue TD, Winkelman-Sim DC, Schmutz SM. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genet Sel Evol*. febrero de 2002;34(1):105.

97. El Moujahid EM, Chen S, Jin S, Lu Y, Zhang D, Ji C, et al. Association of leptin receptor gene polymorphisms with growth and feed efficiency in meat-type chickens. *Poultry Science*. agosto de 2014;93(8):1910-5.
98. Bhuiyan MSA, Kim NK, Cho YM, Yoon D, Kim KS, Jeon JT, et al. Identification of SNPs in MYOD gene family and their associations with carcass traits in cattle. *Livestock Science*. diciembre de 2009;126(1-3):292-7.
99. Varvio SL, Iso-Touru T, Kantanen J, Viitala S, Tapio I, Mäki-Tanila A, et al. Molecular anatomy of the cytoplasmic domain of bovine growth hormone receptor, a quantitative trait locus. *Proc R Soc B*. 7 de julio de 2008;275(1642):1525-34.
100. Simões R, Rodrigues Santos A. Factors and molecules that could impact cell differentiation in the embryo generated by nuclear transfer. *Organogenesis*. 2 de octubre de 2017;13(4):156-78.