UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

"Impacto de la clonación de embriones en los parámetros genómicos productivos en bovinos de carne (*bos taurus*) mantenidos en ambiente tropical"

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

Autor:

Herrera Mallitasig Jenny Lucia

Tutor:

Gutiérrez Reinoso Miguel Ángel, PhD.

Co-tutor:

García Herreros Manuel, PhD.

LATACUNGA-ECUADOR

2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

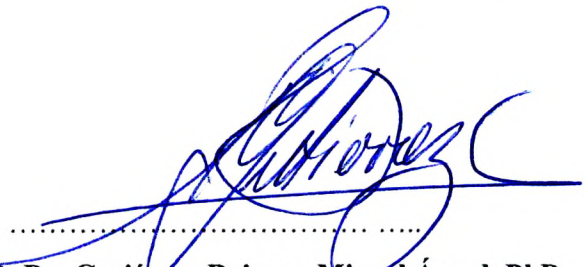
En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación **"Impacto de la Clonación de embriones en los parámetros genómicos productivos en bovinos de carne (*Bos taurus*) mantenidos en ambiente tropical "** .

Presentado Herrera Mallitasig Jenny Lucia, 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, 09, abril, 2025



PhD. Dr. Gutiérrez Reinoso Miguel Ángel, PhD.

CI. 0502236623

APROBACIÓN TRIBUNAL

El Trabajo de Titulación: Titulación **Impacto de la Clonación de embriones en los parámetros genómicos productivos 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.Silva Deley Lucia Monserrath

CC: 0602933673

Lector 2

.....

MSc. Toro Molina Blanca Mercedes

CC: 0501720999

DEDICATORIA

Doy gracias a Dios, por guiarme en cada paso de este camino. A mis queridos padres, por su sacrificio y apoyo incondicional en los momentos más difíciles durante la trayectoria de la maestría por enseñarme a cumplir mis sueños y nunca rendirme, agradezco también al apoyo incondicional de mi sobrina que fue la motivación para culminar la maestría gracias por ser un ejemplo de valentía y perseverancia. Su determinación me inspira a superar mis propios desafíos y a perseguir mis metas.

A mi esposo, por ser mi compañero y mi fuerza, este logro es gracias a ustedes.

Jenny Herrera

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Miguel Gutiérrez, mi tutor, cuya guía y liderazgo fueron fundamentales para la culminación de esta maestría. Su experiencia y dedicación me inspiraron a superar cada desafío y alcanzar mis metas. También quiero agradecer al Dr. Manuel García Herreros, mi cotutor, por su valiosa colaboración y sus aportes significativos a esta investigación, también agradezco al Dr. Eduardo Escribano por brindarnos sus conocimientos fueron de mucho aporte para nuestra formación.

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.

Finalmente, mi más sincero agradecimiento a la Universidad Técnica de Cotopaxi por brindarme la oportunidad de realizar esta maestría. Agradezco a la institución por su excelencia académica, sus recursos y el apoyo brindado durante todo el programa. Esta experiencia ha sido invaluable para mi crecimiento profesional y personal.

Jenny Lucia Herrera Mallitasig

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

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

Latacunga, 06, abril, 2025

Jenny Lucia Herrera Mallitasig

CC: 0503585598

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, 06, abril, 2025

.....

Jenny Lucia Herrera Mallitasig

CC: 0503585598

AVAL DEL PRESIDENTE

Quien suscribe, declara que el presente Trabajo de Titulación: **Impacto de la Clonación de embriones en los parámetros genómicos productivos 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 productivos en bovinos de carne *(Bos taurus)* mantenidos en ambiente tropical"

Autora: Herrera Mallitasig Jenny Lucia
Tutor: Dr.Gutiérrez Reinoso Miguel Ángel,PhD.
Co-tutor: DMV.Garcia Herreros Manuel, MSc,PhD.

RESUMEN

La clonación embrionaria permite replicar individuos genéticamente superiores, lo que representa una oportunidad estratégica para acelerar el mejoramiento genético. El presente estudio se centró en analizar los efectos de la clonación embrionaria sobre los parámetros genómicos productivos, considerando la respuesta diferencial de embriones bipartidos (clonados) y completos bajo condiciones tropicales. Se utilizaron embriones bovinos en estadio de blastocisto, divididos en dos grupos: 32 embriones bipartidos (grupo clonación) y 22 embriones completos (grupo control). Se aplicaron técnicas de superovulación, colecta, micromanipulación embrionaria para la bipartición y transferencia embrionaria. El ADN de cada embrión fue extraído y analizado mediante PCR en tiempo real para la detección de 10 SNPs estratégicos ubicados en genes funcionales relacionados con la producción: *CSN2*, *CSN3*, *PAEP*, *GH1*, *GHR*, y *ABCG2*. Se analizaron los genotipos dentro de cada gen y tipo de embrión aplicando análisis de varianza (ANOVA) con pruebas de comparación múltiple (Tukey HSD). Los resultados indicaron que la clonación embrionaria no altera de manera significativa la frecuencia general de los genotipos en la mayoría de los SNPs analizados. Se observaron diferencias significativas en loci específicos como *GHR_F279Y* y *CSN2_245*, donde los embriones bipartidos mostraron mayor frecuencia del genotipo heterocigoto. No hubo diferencias significativas en genes *PAEP_181*, *ABCG2* y *CSN2_411*. La clonación embrionaria mediante bipartición no compromete la integridad genética de los embriones y no genera alteraciones genéticas significativas en la mayoría de los SNPs evaluados demostrando ser viable como herramienta para su integración en programas de mejoramiento genético en bovinos de carne bajo condiciones tropicales.

Palabras clave: Clonación; Bipartición embrionaria; SNP; Genómica bovina; *Bos taurus*.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

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

Author: Herrera Mallitasig Jenny Lucia
Tutor: Dr. Gutiérrez Reinoso Miguel Angel,PhD.
Co-tutor: DMV.Garcia Herreros Manuel, MSc,PhD.

ABSTRACT

Embryo cloning allows the replication of genetically superior individuals, which represents a strategic opportunity to accelerate genetic improvement. The present study focused on analyzing the effects of embryo cloning on genomic production parameters, considering the differential response of split (cloned) and complete embryos under tropical conditions. Blastocyst-stage bovine embryos were divided into two groups: 32 split embryos (cloning group) and 22 complete embryos (control group). Superovulation, collection, embryo micromanipulation for splitting, and embryo transfer techniques were applied. DNA from each embryo was extracted and analyzed by real-time PCR for the detection of 10 strategic SNPs located in functional genes related to production: *CSN2, CSN3, PAEP, GH1, GHR,* and *ABCG2*. Genotypes within each gene and embryo type were analyzed by applying analysis of variance (ANOVA) with multiple comparison tests (Tukey HSD). The results indicated that embryonic cloning does not significantly alter the overall frequency of genotypes for most of the SNPs analyzed. Significant differences were observed at specific loci such as *GHR_F279Y* and *CSN2_245*, where split embryos showed higher frequency of the heterozygous genotype. There were no significant differences in *PAEP_181, ABCG2* and *CSN2_411* genes. Embryo cloning by splitting does not compromise the genetic integrity of the embryos and does not generate significant genetic alterations in most of the SNPs evaluated, demonstrating that it is a viable tool for integration into genetic improvement programs in beef cattle under tropical conditions.

Keywords: Cloning; Embryo splitting; SNP; Bovine genomics; *Bos taurus*.

Olga María de los Ángeles Cárdenas Guanoluisa con cédula de identidad número:1707530141; Magíster 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: **Herrera Mallitasig Jenny Lucia** aspirante a magister en **Ciencias Veterinarias.**

Latacunga, 1 de abril, 2025

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

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN 1

JUSTIFICACIÓN 2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 3

HIPÓTESIS O PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN: 6

Hipótesis Negativa 6

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN 7

OBJETIVO GENERAL 7

OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 7

CAPÍTULO I. 8

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA 8

1.1. ANTECEDENTES 8

1.2. BIOTECNOLOGÍA EN GANADERÍA 10

1.2.1. Impacto de la biotecnología en la producción de carne bovina 12

1.3. CLONACIÓN DE EMBRIONES EN BOVINOS 14

1.3.1. Proceso de clonación mediante transferencia nuclear de células somáticas 14

1.3.2. Clonación en bovinos de carne: aplicaciones y resultados 16

1.4. PARÁMETROS GENÓMICOS EN BOVINOS DE CARNE 18

1.4.1. Factores Cualitativos 18

1.4.2. Factores Cuantitativos 18

1.4.3. Técnicas de evaluación genética 19

1.5. PRUEBAS DE PROGENIE 20

1.5.1. Técnicas Genómicas Modernas 20

1.6. IMPACTO DE LA CLONACIÓN EN LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS 22
1.6.1. Ventajas de la clonación en la conversión alimenticia 23
1.6.2. Adaptación de los bovinos clonados a ambientes tropicales 23
1.7. PRODUCCIÓN DE CARNE EN CLIMAS TROPICALES 25
1.8. TÉCNICAS DE MEJORA GENÉTICA EN BOVINOS 26
1.8.1. Selección Genética y Programas de Mejoramiento 26
1.8.2. Inseminación Artificial (IA) 27
1.8.3. Transferencia de Embriones (TE) y Fertilización In Vitro (FIV)..... 28
1.8.4. Clonación y Edición Genética 28
1.9. BIPARTICIÓN EMBRIONARIA EN BOVINOS 28
1.9.1.Técnicas para la bipartición de embriones en bovinos 29
1.9.2. Análisisgenómico..... 29
1.10. EPIGENÉTICA EN EMBRIONES TRANSFERIDOS..... 30
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS..... 33
2.1. Ubicación..... 33
2.1.2. Pluviosidad..... 34
2.2. Tipo de investigación 34
2.3. Diseño de la investigación..... 35
2.4. Método de investigación 36
2.4.1. Técnicas utilizadas..... 36
2.4.1.2. Selección de receptoras de embriones 36
2.4.1.4. Colecta de embriones..... 37
Extracción de ADN y Tipificación genes de Interés Comercial 39
Análisis bioinformático: 39

2.5. Análisis de Resultados y Procesamiento de Datos 44
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 45
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 56
CONCLUSIONES 56
RECOMENDACIONES 57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Resultados asociados a la clonación en bovinos de carne 17
Tabla 2 Técnicas Genómicas Modernas..... 20
Tabla 3 Técnicas de evaluación genética en bovinos de carne 21
Tabla 4 Técnicas de mejora genética en bovinos..... 27
Tabla 5 Principales genes asociados con la productividad en bovinos..... 32
Tabla 6 Diseño experimental para el análisis genómico en embriones bovinos bipartidos y completos 35
Tabla 7 Polimorfismos en genes asociados a rasgos productivos..... 40
Tabla 8 Frecuencia relativa de genotipos por SNP funcional en embriones bovinos bipartidos y completos (Bos taurus)..... 45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribución de genotipos del SNP CSN2_245 (β-caseína A2) 47
Figura 2 Distribución de genotipos del SNP CSN2_411 (β-caseína AB) 48
Figura 3 Distribución de copias del alelo (genotipo) favorable en el gen ABCG2 48
Figura 4 Distribución de copias del alelo (genotipo) favorable en el gen GH1_2291 50
Figura 5 Distribución de copias del alelo (genotipos) favorable en el gen GHR_F279Y 51
Figura 6 Distribución de genotipos del SNP CSN3_470 (κ-caseína) 52
Figura 7 Distribución de genotipos para el SNP PAEP_181 53
Figura 8 Distribución de genotipos para el SNP PAEP_225 54
Figura 9 Distribución de genotipos para el SNP PAEP_239 54
Figura 10 Distribución de genotipos para el SNP PAEP_312 55

INFORMACIÓN GENERAL:

Título del Trabajo de Titulación: "Impacto de la clonación de embriones en los parámetros genómicos productivos 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

La ganadería es un pilar fundamental en la economía de muchas regiones del mundo, particularmente en América Latina, donde la producción de carne bovina representa una parte significativa del Producto Interno Bruto agrícola [1]. El aumento de la población y la creciente demanda global de carne, enfrenta retos cada vez más complejos. Por lo tanto, se requieren innovaciones tecnológicas que permitan aumentar la eficiencia productiva sin comprometer la sostenibilidad [2].

En este contexto, para mejorar la productividad y la calidad de la carne bovina han emergido las biotecnologías reproductivas, como la clonación de embriones, como herramientas prometedoras [2]. Sin embargo, estas tecnologías en ambientes tropicales, aún no está completamente comprendida, lo que explica la necesidad de investigaciones profundas en esta área.

La clonación de embriones, como la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, por sus siglas en inglés), permite replicar individuos con características genéticas deseables productivas como una mejor conversión alimenticia y calidad de carne. Esta biotecnología se ha utilizado con éxito en la mejora genética de diversas especies, pero su aplicación en bovinos de carne, y más aún en condiciones tropicales, presenta desafíos únicos [3]. El ambiente tropical impacta negativamente en la productividad ganadera debidos a las altas temperaturas, humedad elevada y disponibilidad de forrajes.

Varios parámetros productivos como la ganancia de peso diaria, la eficiencia alimenticia y la calidad de la carne han mostrado una mejora potencial mediante el uso de la clonación de embriones en bovino, sin embargo, varios estudios han revelado que los embriones clonados pueden presentar tasas de gestación y supervivencia postnatal bajas y variables [3].

El principal objetivo de este estudio es evaluar el impacto de la clonación de embriones en los parámetros genómicos y productivos de los bovinos de carne mantenidos en un ambiente tropical; y comprender cómo la clonación afecta aspectos clave asociados a rasgos productivos, en el contexto de las condiciones climáticas extremas de los trópicos. Existen mecanismos epigenéticos que podrían

influir en la expresión génica y modificar la adaptación de los animales al estrés ambiental.

Finalmente, la investigación busca contribuir al conocimiento científico sobre la interacción entre la genética avanzada, el ambiente uterino y la clonación , pudiendo obtener protocolos más eficientes y sostenibles para la producción de carne bovina en regiones con condiciones climáticas extremas, aunque los costos iniciales de esta biotecnología pueden ser elevados, los posibles beneficios a largo plazo, como la mejora en la conversión alimenticia y la reducción de costos asociados con enfermedades y mortalidad, podrían hacer que esta tecnología sea rentable y viable para los productores ganaderos.

JUSTIFICACIÓN

La presente investigación que trata la clonación de embriones sobre el impacto en los parámetros genómicos productivos de bovinos de carne en ambientes tropicales posee un gran potencial para convertir la industria ganadera. Identificar tecnologías que optimicen la producción de manera sostenible es esencial, donde la demanda global de carne bovina sigue en aumento [4], para el 2030 el consumo mundial de carne podría aumentar un 40% generando presión sobre los sistemas de producción actuales.

La clonación de embriones podría mejorar significativamente la productividad ganadera. Esta herramienta biotecnológica permite replicar individuos con características genéticas superiores, con mejoras en la ganancia de peso, la eficiencia alimenticia y la calidad de la carne. Sin embargo, en entornos con condiciones climáticas diferentes como los trópicos su adopción puede ser viable.

Desde un punto de vista científico, esta investigación contribuirá al conocimiento sobre la interacción entre la genética avanzada, el ambiente tropical y la técnica de clonación. Los resultados permitirán entender mejor los mecanismos epigenéticos que podrían afectar la expresión de genes relacionados con la producción y la adaptación al estrés ambiental y uterino en el que se desarrolla. Esto es crucial, ya que estudios previos han mostrado que hasta el 30% de los bovinos clonados presentan variaciones fenotípicas no esperadas debido a factores ambientales [1].

Este estudio incluye la necesidad de mejorar la seguridad alimentaria, optimizar los recursos naturales y aumentar la rentabilidad de los productores ganaderos; la producción eficiente de carne contribuye a la economía de los países dependientes de la ganadería. La industria cárnica representa el 15% del PIB agrícola en América Latina. Por tanto, los participantes en esta investigación se incluyen a ganaderos, técnicos en reproducción animal, genetistas, veterinarios y académicos especializados en biotecnología animal [2].

Económicamente, se estima que una mejora del 10% en la conversión alimenticia podría reducir los costos de producción en un 15%, lo que tendría un impacto significativo en la rentabilidad de los productores. Aunque el costo inicial de esta tecnología es elevado, evaluar la viabilidad de la clonación de embriones en sistemas de producción tropicales es fundamental; su implementación podría generar beneficios a largo plazo si se demuestra que mejora la eficiencia productiva. [1].

Es así como, esta investigación es importante porque aborda un problema relevante para la industria ganadera global, contribuye al avance del conocimiento científico en biotecnología animal y tiene el potencial de generar beneficios económicos y sociales significativos, los resultados obtenidos podrían servir de base para el desarrollo de políticas públicas y estrategias de manejo ganadero más sostenibles y eficientes en ambientes tropicales.

El presente estudio evaluó las diferencias genómicas entre embriones bovinos bipartidos y completos mediante el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en genes asociados con la producción, calidad y funcionalidad de la leche. La hipótesis central fue que la técnica de bipartición embrionaria no altera significativamente la composición genética de los embriones, pero podría influir en la frecuencia de ciertos genotipos. Se analizaron un total de diez SNPs distribuidos en genes funcionales clave como CSN2, CSN3, PAEP, GH1, GHR y ABCG2.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción de carne bovina (*Bos taurus*) enfrenta desafíos significativos en la actualidad debido a la creciente demanda mundial, la necesidad de mejorar la eficiencia productiva y la sostenibilidad en ambientes tropicales. Según la

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2023) [4], la demanda de carne bovina aumentará en un 76% para el año 2050, lo que obliga a los productores a buscar estrategias innovadoras para optimizar la productividad [2]. En este contexto, la clonación de embriones en condiciones tropicales aún no está claramente definido, sin embargo, la clonación ha emergido como una biotecnología con el potencial de mejorar los parámetros genómicos y productivos de los bovinos de carne.

El ambiente tropical representa un desafío para la producción bovina, caracterizado por altas temperaturas, humedad relativa elevada y estacionalidad de los recursos forrajeros [3]. En América Latina, se concentra una parte significativa de la producción mundial de carne bovina, donde la eficiencia productiva en ambientes tropicales es un 30% menor en comparación con regiones templada. Por tanto, las condiciones climáticas extremas podrían afectar negativamente la eficiencia reproductiva, el crecimiento y la calidad de la carne. [2].

La transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, por sus siglas en inglés), permite la replicación de individuos con características genéticas superiores, esto ofrece la posibilidad de mejorar parámetros productivos de interés comercial [5]. No obstante, estudios recientes han mostrado resultados variables en cuanto a la viabilidad de los embriones clonados, las tasas de gestación y la supervivencia postnatal en condiciones tropicales. Por ejemplo, investigaciones realizadas en Brasil indican que la tasa de gestación de embriones clonados en bovinos de carne puede variar entre un 30% y un 50%, mientras que en ambientes templados puede superar el 60% [5].

Además, la variabilidad genética en poblaciones clonadas es un tema de preocupación. Aunque la clonación busca la uniformidad genética, factores epigenéticos pueden influir en la expresión génica, afectando la adaptación al estrés térmico, la resistencia a enfermedades y otros parámetros productivos críticos. Un estudio de (Wu y Zan 2012)[3] reportó que el 25% de los bovinos clonados en ambientes tropicales presentaron problemas metabólicos relacionados con la adaptación al calor, en comparación con solo el 10% en animales no clonados.

(Shakweer et al. 2023) [4] menciona que, el costo de producir un embrión clonado puede ser hasta 10 veces mayor que el de un embrión convencional, lo que plantea interrogantes sobre la viabilidad económica de esta tecnología en sistemas de producción extensivos típicos de regiones tropicales. En este contexto, surge la necesidad de evaluar de manera integral el impacto de la clonación de embriones en los parámetros genómicos productivos de bovinos de carne mantenidos en ambientes tropicales. Es importante determinar si esta biotecnología puede contribuir efectivamente a mejorar la productividad, la eficiencia reproductiva y la calidad de la carne, considerando las limitaciones impuestas por el entorno y los costos asociados.

La falta de evidencia concluyente sobre los beneficios y limitaciones de la clonación de embriones en condiciones tropicales no está bien dilucidado y comprendido. Por tanto, se han planteado varias preguntas: ¿Cómo afecta la clonación de embriones a los parámetros genómicos productivos de bovinos de carne en ambientes tropicales? ¿Qué impacto tiene en la viabilidad embrionaria, la eficiencia reproductiva, la calidad de la carne y la adaptación al estrés ambiental? ¿Es económicamente viable implementar esta tecnología en sistemas de producción tropicales?

Para orientar decisiones en la gestión ganadera, el mejoramiento genético y la sostenibilidad de la producción de carne bovina en regiones tropicales es fundamental responder a estas preguntas. Esta investigación busca aportar datos investigativos que permitan evaluar de manera crítica el uso de la clonación de embriones como herramienta para optimizar la producción bovina en contextos desafiantes, contribuyendo así al desarrollo de estrategias más eficientes y sostenibles en la industria cárnica.

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 productivos, 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 productivos de los bovinos de carne (*Bos taurus*) bajo condiciones de ambiente tropical, y podría o no afectar la epigenética en la variabilidad de los genes?

Hipótesis Negativa

Hipótesis: La clonación de embriones en bovinos de carne *(Bos taurus)* no tiene un impacto significativo en los parámetros genómicos productivos, 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 productivos de los bovinos de carne *(Bos taurus)* bajo condiciones de ambiente tropical, y cómo afecta la epigenética en la variabilidad de los genes.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto de la clonación de embriones en los parámetros genómicos productivos de los bovinos de carne (*Bos taurus*) mantenidos en un ambiente tropical, con el fin de determinar su viabilidad, eficiencia y potencial para mejorar la productividad en condiciones climáticas adversas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

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

CAPÍTULO I.

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1.ANTECEDENTES

En las últimas décadas las técnicas de reproducción asistida en el ganado han avanzado significativamente especialmente en áreas como la producción de embriones *in vitro* y en la clonación de embriones; estos avances han tenido un impacto importante en la mejora genética y la eficiencia productiva de los bovinos de carne en diversas regiones del mundo, incluida América del Sur [1]. En esta región se representa un porcentaje significativo de la población mundial de ganado bovino.

Mediante técnicas como la transferencia nuclear (clonación somática), habre nuevas puertas para la mejora genética, permite reproducir animales con características deseadas de manera más precisa, sin embargo, los desafíos y riesgos, como la eficiencia en las tasas de éxito y las posibles diferencias epigenéticas y genéticas entre los animales clonados y los no clonados son evidentes [2].

Viena et al., (2018) [1] en su publicación titulada ´´*A historical perspective of embryo-related technologies in South America*´´ señala que, la producción de ganado es de gran importancia para la economía de muchos países sudamericanos, región que representa el 23% de la población mundial de bovinos. No es sorprendente que la industria de los embriones esté históricamente muy activa en esta región, especialmente en Argentina y Brasil. Menciona que, en los últimos veinte años, el campo de la transferencia de embriones bovinos ha experimentado un cambio notable en Brasil, principalmente debido a la producción de embriones in vitro (IVEP).

La producción total de embriones aumentó de manera drástica, con constantes cambios en las principales características de la industria de los embriones, pasando de nichos de mercado a producción masiva, y de la carne de res al sector lácteo, con un enfoque creciente en razas europeas frente a razas cebú. Recientemente, la IVEP también ha emergido en otros países sudamericanos, además el artículo resume y describe los factores que impulsaron los cambios en la industria de los embriones brasileña y discute algunos de los impactos sobre otras tecnologías relacionadas con los embriones, lo que ofrece una base sólida para comprender la evolución de estas técnicas en la región y su aplicabilidad en el ámbito de la mejora genética en bovinos de carne.

Por otro lado, Hansen (2023) [2] presentó un artículo científico llamado ´´Some challenges and unrealized opportunities toward widespread use of the *in vitro*-produced embryo in cattle production´´ que describe que la tecnología de los embriones in vitro (IVE) han mostrado un gran potencial en la mejora genética del ganado, especialmente en la optimización de la fertilidad femenina y en la producción de descendencia con características superiores en salud y rendimiento productivo. Esta revisión analiza los desafíos y las oportunidades aún no aprovechadas en el uso de embriones producidos in vitro en la industria ganadera, considerando las investigaciones previas sobre la maduración de oocitos in vitro, fertilización, desarrollo embrionario, así como su relación con tecnologías emergentes como la edición genética, la clonación nuclear de células somáticas y la generación de gametos in vitro.

A través de una revisión sistemática el autor analizó diversas investigaciones y estudios previos para identificar las principales áreas de mejora que se deben abordar para una implementación más eficiente de la transferencia de embriones en el ganado. Se destacaron varios problemas técnicos que limitan la aplicación masiva de esta tecnología, como la necesidad de mejorar la obtención de oocitos de hembras genéticamente superiores, ya que la calidad y cantidad de estos son factores clave en la producción de embriones viables, aunque se han logrado avances en la fertilización y el desarrollo embrionario, aún persiste una alta proporción de embriones que no se convierten en transferibles viables. Los resultados sugieren que el futuro de la tecnología de embriones in vitro depende de

superar estos obstáculos técnicos y de implementar programas de transferencia de embriones más efectivos y rentables para la industria ganadera.

Finalmente, Wu (2022) [3] en su artículo ´´Enhance beef cattle improvement by embryo biotechnologies ´´ habla sobre la biotecnología embrionaria y mención que, esta ha emergido como una de las áreas más destacadas dentro de la biotecnología aplicada a la ganadería a nivel mundial ya que, a lo largo del tiempo, esta tecnología ha experimentado tres transformaciones principales que han impulsado su desarrollo. En primer lugar, la transferencia tradicional de embriones, que consiste en la producción in vivo de embriones mediante la superovulación de donantes, también la producción in vitro de embriones, donde se recuperan oocitos y se llevan a cabo técnicas de fertilización in vitro. Finalmente, la investigación señala que, la clonación mediante transferencia nuclear de células somáticas ha abierto nuevas oportunidades en la producción de animales transgénicos y que esta evolución ha llevado a la biotecnología embrionaria a ser ampliamente utilizada en la industria tanto de la carne como de la leche, convirtiéndose en un negocio internacional de gran relevancia.

En este contexto, la mejora del ganado bovino de carne junto con la aplicación de biotecnología embrionaria permite: aumentar la producción de terneros a través de la utilización eficiente de gametos, mejorar los esquemas de cría mediante la ovulación múltiple y transferencia de embriones. Además de utilizar tecnologías avanzadas complementarias como la fertilización *in vitro*, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, la selección de sexo, y la clonación. Otras herramientas biotecnológicas como de desarrollo de blastocistos, células madre embrionarias y la preservación de recursos genéticos del ganado de carne, abren nuevas posibilidades para el futuro de la producción ganadera, estableciendo nuevas oportunidades para la mejora de la calidad y cantidad de la producción cárnica a nivel mundial.

1.2.BIOTECNOLOGÍA EN GANADERÍA

El uso de herramientas y técnicas biotecnológicas para mejorar la producción animal, optimizar la reproducción, aumentar la eficiencia alimentaria y mejorar la sanidad del ganado son fundamentales actualmente y se las denomina biotecnología

en ganadería. Según Shakweer et al., (2023) [5] en las últimas décadas la biotecnología aplicada a la ganadería ha evolucionado significativamente, con múltiples avances en la manipulación genética, la reproducción asistida y la mejora de razas con características productivas superiores.

La biotecnología es definida por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [6] como "la aplicación de la ciencia y la ingeniería a los organismos vivos o sus derivados para la producción de bienes y servicios", esta abarca técnicas como la inseminación artificial, la transferencia de embriones, la clonación, la selección genómica y la edición genética mediante tecnologías como CRISPR-Cas9 [5]. La biotecnología en ganadería tiene como objetivo principal la mejora genética y la optimización de la eficiencia productiva de los animales, asegurando un desarrollo sostenible y una mayor seguridad alimentaria [7].

La selección genómica ha sido reemplazada en gran medida a la selección genética tradicional [8], el uso de marcadores moleculares y la genotipificación masiva han mejorado la precisión en la elección de reproductores con alto valor genético.

La clonación de embriones, en particular, ha permitido la reproducción de individuos con características sobresalientes, optimizando la uniformidad genética y la producción [6], la clonación y la manipulación genética han abierto nuevas posibilidades en la producción animal. Según Wells, et al. (2005) [9] la clonación de bovinos junto con la edición génica, permite la modificación de genes específicos para mejorar la eficiencia productiva o la resistencia a enfermedades.

La biotecnología también se aplica en la mejora de la alimentación del ganado mediante el uso de probióticos, enzimas digestivas y aditivos que optimizan la conversión alimenticia pues, el uso de suplementos biotecnológicos en la dieta bovina puede reducir la emisión de metano y mejorar la digestión de la fibra [5]. El desarrollo de vacunas recombinantes y técnicas de diagnóstico molecular ha permitido un mejor control de enfermedades en bovinos, estas tecnologías han reducido la incidencia de patologías infecciosas y han optimizado los programas de sanidad en la producción ganadera, pues la biotecnología ganadera es un pilar fundamental para el desarrollo de sistemas de producción más sostenibles y

eficientes. Según [7] el futuro de la biotecnología en la ganadería dependerá del desarrollo de nuevas tecnologías de edición genética y de la aceptación social y regulatoria de estas prácticas.

Es así como, la biotecnología en ganadería ha revolucionado la producción bovina a nivel mundial, proporcionando herramientas para la mejora genética, la reproducción asistida, la nutrición y la sanidad animal y su implementación permite la obtención de animales más productivos y adaptados a las condiciones climáticas y ambientales, asegurando así un suministro de carne eficiente y sostenible.

1.2.1. Impacto de la biotecnología en la producción de carne bovina

La biotecnología ha revolucionado la producción de carne bovina mediante la mejora genética, la optimización de la alimentación, el control sanitario y la reproducción asistida. Según Galli (2023) [6] las herramientas biotecnológicas han permitido incrementar la eficiencia productiva, mejorar la calidad de la carne y reducir el impacto ambiental de la ganadería, pues uno de los principales impactos de la biotecnología en la producción de carne bovina es la selección genética avanzada. La utilización de marcadores moleculares y la selección genómica permiten identificar animales con mejores características productivas, como mayor ganancia de peso, mejor conversión alimenticia y mayor calidad de carne [7].

La implementación de programas de mejora genética basados en análisis de ADN ha facilitado la selección de toros y vacas con genes asociados a una mayor eficiencia en la producción de carne. Según Moore y Hasler (2017) [8] estos avances han reducido los tiempos de engorde y han optimizado la composición de la carne, mejorando su terneza y contenido de grasa intramuscular, ya que, las técnicas de reproducción asistida, como la inseminación artificial, la fertilización in vitro (FIV) y la transferencia de embriones, han permitido la propagación de animales con alto valor genético.

Según Shakweer et al., (2023) [5] la clonación de bovinos ha sido utilizada para replicar individuos con características excepcionales, asegurando uniformidad en la calidad de la carne, la clonación y la edición genética han permitido mejorar la resistencia de los bovinos a enfermedades y condiciones climáticas adversas. Un estudio de Viana et al., (2018) [1] demostró que la clonación de bovinos

seleccionados por su eficiencia alimentaria y calidad cárnica puede reducir los costos de producción y mejorar la rentabilidad en sistemas ganaderos intensivos.

La biotecnología también ha impactado la producción de carne a través de mejoras en la alimentación bovina, el uso de aditivos biotecnológicos, como probióticos, enzimas digestivas y ácidos grasos esenciales, ha permitido optimizar la conversión alimenticia y reducir la emisión de metano en el ganado, además, los avances en la formulación de dietas basadas en el perfil genético del animal han permitido mejorar el crecimiento y la calidad de la carne. Según Wu Zan (2022) [3] la alimentación de precisión basada en herramientas biotecnológicas ha incrementado la eficiencia del engorde y ha reducido el impacto ambiental de la ganadería.

El desarrollo de vacunas recombinantes y tratamientos biotecnológicos ha mejorado significativamente la sanidad del ganado, según Bagle (2012) [10] el uso de vacunas diseñadas mediante ingeniería genética ha reducido la prevalencia de enfermedades infecciosas en bovinos, disminuyendo la necesidad de antibióticos y promoviendo una producción de carne más saludable. Las tecnologías de diagnóstico molecular han permitido la detección temprana de enfermedades, lo que ha mejorado la eficiencia en la gestión sanitaria de los rebaños y el monitoreo genético de patógenos y la identificación de genes de resistencia a enfermedades han contribuido a la reducción de pérdidas productivas en la industria cárnica [6].

Uno de los desafíos de la producción de carne bovina es su impacto ambiental, particularmente en la emisión de gases de efecto invernadero, pues la biotecnología ha permitido desarrollar estrategias para mitigar estos efectos, como la selección de bovinos con mejor eficiencia alimentaria y la utilización de dietas optimizadas para reducir la producción de metano [8]. Además, la edición genética ha permitido modificar ciertos genes en bovinos para mejorar su adaptación a climas cálidos, reduciendo el estrés térmico y mejorando su desempeño productivo en regiones tropicales [10].

Estas innovaciones biotecnológicas han sido significativas en la producción de carne bovina abarcando desde la mejora genética hasta la nutrición y la sanidad animal.

1.3. CLONACIÓN DE EMBRIONES EN BOVINOS

La clonación de embriones en bovinos es una técnica biotecnológica utilizada para la reproducción de individuos genéticamente idénticos, entre los objetivos de los sistemas de producción esta preservar y multiplicar animales con características productivas y genéticas deseables, por tanto, la clonación de embriones esta técnica ha cobrado relevancia en la producción ganadera, especialmente en sistemas orientados a la producción de carne de alta calidad. La clonación embrionaria en bovinos se basa en dos enfoques principales: la división de embriones y la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, por sus siglas en inglés) [5] [8].

La primera técnica consiste en obtener gemelos genéticamente idénticos a partir de estadios de desarrollo embrionario temprano, mientras que la segunda permite clonar animales adultos a partir de células diferenciadas; sin embargo, el uso de la clonación somática en la producción de carne bovina ha generado debates éticos y regulatorios a nivel mundial [6]. En países como Estados Unidos y Brasil, la carne de bovinos clonados es permitida y considerada segura para el consumo humano, mientras que en la Unión Europea persisten restricciones debido a preocupaciones sobre el bienestar animal y la biodiversidad [9]. Sin embargo, la aplicación masiva de clonación embrionaria podría representar un avance significativo en la producción ganadera, asegurando carne de alta calidad y mejorando la eficiencia de los sistemas productivos.

1.3.1. Proceso de clonación mediante transferencia nuclear de células somáticas

Una de las herramientas biotecnológicas es la técnica de clonación que permite la creación de organismos genéticamente idénticos a partir del núcleo de una célula somática: la Transferencia Nuclear de Células Somáticas (Somatic Cell Nuclear Transfer, SCNT, por sus siglas en inglés); es este procedimiento ha sido ampliamente utilizado en la clonación de bovinos con fines de mejoramiento genético, optimización de la producción cárnica y conservación de razas con características productivas sobresalientes [2]. Este proceso de SCNT consiste en la extracción del núcleo de una célula somática de un donante y de csu transferencia a un ovocito enucleado (al que se le ha eliminado su material genético).

El proceso de SCNT consta de varias etapas, que deben realizarse con precisión para garantizar la viabilidad del embrión clonado, en primer lugar, se obtiene la célula somática del donante, seleccionando un bovino con características genéticas deseadas, para ello, pueden utilizarse fibroblastos de piel, células de la glándula mamaria o musculares, asegurando que el material genético esté en óptimas condiciones para la clonación [5]. Luego, se procede a la obtención y enucleación del ovocito receptor, el cual es recuperado de hembras bovinas mediante aspiración folicular, posteriormente, se extrae el núcleo del ovocito mediante microcirugía, asegurando que el material genético original sea eliminado completamente para evitar interferencias en el desarrollo embrionario [6].

Una vez obtenido el ovocito enucleado, se realiza la transferencia del núcleo de la célula somática, este se introduce cuidadosamente en el citoplasma del ovocito utilizando una micropipeta, garantizando la integridad del material genético y las estructuras celulares involucradas en la reprogramación del embrión [7]. Posteriormente, se lleva a cabo la fusión y activación del embrión reconstruido mediante la aplicación de un pulso eléctrico, lo que permite la unión del núcleo con el citoplasma del ovocito y desencadena el inicio del desarrollo embrionario sin necesidad de fertilización [8].

El embrión reconstruido es cultivado en condiciones controladas en un medio de desarrollo in vitro, donde se monitorea su división celular hasta que alcanza la etapa de blastocisto, lo cual ocurre entre los días 6 y 7 de desarrollo. En esta fase, se evalúa la calidad morfológica del embrión para determinar su viabilidad antes de ser transferido a una madre sustituta [9], luego, los embriones viables son implantados en el útero de una hembra receptora previamente sincronizada hormonalmente. Para confirmar el éxito de la implantación, se realizan controles ecográficos que permiten detectar el desarrollo del embrión en la etapa temprana de gestación [10].

Finalmente, tras un período de gestación normal de aproximadamente 280 días en bovinos, el ternero clonado nace, en esta fase, se realizan pruebas genéticas y fenotípicas para verificar que el animal clonado es genéticamente idéntico al donante original. Además, se monitorean su salud y desarrollo para detectar

posibles anomalías asociadas al proceso de clonación [11]. A pesar de los avances en la técnica de SCNT, su eficiencia sigue siendo limitada debido a las bajas tasas de desarrollo embrionario y los problemas de reprogramación epigenética.

La clonación mediante SCNT ha permitido avances significativos en la ganadería, sin embargo, su eficiencia sigue siendo baja, con tasas de éxito que oscilan entre el 5% y el 15% [8]. Algunos de los principales desafíos incluyen [5] [8]:

- Muchos embriones clonados no logran desarrollarse correctamente debido a problemas en la reprogramación epigenética [2].
- Se ha observado una mayor tasa de abortos y partos prematuros en comparación con la reproducción natural [2].
- Algunos terneros clonados presentan el *síndrome del gran tamaño fetal*, que puede generar complicaciones en el parto y afectar la viabilidad del neonato [2].
- La tecnología SCNT requiere equipamiento especializado y personal altamente capacitado, lo que limita su accesibilidad para pequeños y medianos productores [2].

A pesar de estas limitaciones, los avances en la clonación bovina han mejorado la eficiencia del proceso, y su uso se ha consolidado en programas de mejoramiento genético y conservación de razas bovinas de alto valor productivo, la clonación mediante SCNT es una herramienta poderosa en la biotecnología reproductiva bovina [11].

1.3.2. Clonación en bovinos de carne: aplicaciones y resultados

La clonación de bovinos de carne, mediante SCNT, permite la reproducción de animales genéticamente idénticos a un animal de élite, ha abierto un amplio campo de posibilidades en la ganadería moderna, específicamente en la mejora genética y la producción de carne de alta calidad [6].

Entre las aplicaciones la clonación en bovinos de carne es la mejora genética, para obtener replicas exactas de un bovino con características sobresalientes, como mayor calidad en la carne (por ejemplo, mayor marmoleo o mejor textura) [11], evitando la pérdida de estos rasgos importantes para la industria [12].

Otra de las aplicaciones es obtener animales resistentes a enfermedades, multiplicando animales con una resistencia genética superior a enfermedades comunes en el ganado, esto podría reducir el uso de antibióticos y otros tratamientos veterinarios, mejorando la salud general del rebaño y, por ende, la calidad de la carne [13]. Finalmente, la clonación podría jugar un papel crucial en la preservación de especies en peligro de extinción debido a la pérdida genética o la disminución de su número en la naturaleza [6].

Los resultados de la clonación en bovinos de carne han demostrado ser prometedores en varios aspectos, pues el éxito de la clonación ha sido variable debido a desafíos técnicos y biológicos. En términos de rendimiento productivo, los bovinos clonados han mostrado una tasa de conversión de alimentos similar a la de los animales no clonados, con algunos estudios mostrando incluso una mejora en ciertas características como la calidad de la carne y la tasa de crecimiento [12], en cuanto a la salud y la longevidad, los terneros clonados a menudo presentan algunas complicaciones al nacer, como un mayor peso al nacer y mayores tasas de mortalidad neonatal. Sin embargo, los animales que sobreviven tienen una esperanza de vida comparable a la de los bovinos tradicionales [13]. La eficiencia reproductiva sigue siendo un área en desarrollo, con una tasa de éxito en la clonación que sigue siendo baja en comparación con los métodos tradicionales de reproducción [9].

A continuación, en la tabla se presenta las aplicaciones clave y los resultados asociados a la clonación en bovinos de carne.

Tabla 1 Resultados asociados a la clonación en bovinos de carne

Aplicación	Resultado o Beneficio	Desafíos y Limitaciones
Mejora genética (selección de bovinos de élite)	Replicación exacta de características deseables	Alta complejidad técnica y bajas tasas de éxito inicial
Producción de animales resistentes a enfermedades	Reducción de antibióticos, mejora de la salud del rebaño	Costos elevados y retos en la clonación de animales resistentes
Preservación de especies en peligro de extinción	Mantener y preservar líneas genéticas valiosas	Alta variabilidad en los resultados de clonación
Mejora en la calidad de la carne	Incremento en la calidad de la carne (marmoleo, textura)	Mayor peso al nacer y complicaciones en el proceso de gestación

Fuente: [11]

La clonación en bovinos de carne tiene aplicaciones significativas en la mejora genética y la producción de carne, pero su uso a gran escala sigue enfrentando desafíos técnicos y económicos que deben resolverse para optimizar la eficiencia y viabilidad comercial de esta biotecnología.

1.4.PARÁMETROS GENÓMICOS EN BOVINOS DE CARNE

El estudio de los parámetros genómicos en bovinos de carne es fundamental para mejorar la eficiencia productiva y la calidad de la carne, la genética juega un papel clave en la determinación de características económicas importantes, como el crecimiento, la conversión alimenticia, la composición de la canal y la resistencia a enfermedades. Las tecnologías genómicas en la ganadería han revolucionado, permitiendo una acelerada de animales con características deseables y una presión de selección más precisa [11].

Los factores genéticos en bovinos de carne incluyen una amplia gama de características hereditarias que impactan la producción, eficiencia y calidad del producto final. Estos factores pueden dividirse según Melo et al. (2007) [12] en **factores cualitativos y cuantitativos.**

1.4.1. Factores Cualitativos

Los factores cualitativos están controlados por pocos genes y siguen un patrón de herencia mendeliana, algunos ejemplos incluyen el color del pelaje, la presencia o ausencia de cuernos y ciertos defectos congénitos, ya que, estos rasgos, aunque importantes, tienen menor impacto en la producción de carne que los factores cuantitativos [12].

1.4.2. Factores Cuantitativos

Los factores cuantitativos son aquellos que están determinados por múltiples genes y son influenciados por el ambiente, se evalúan mediante parámetros estadísticos y son esenciales en la mejora genética de bovinos de carne y entre los principales se incluyen:

- **Ganancia de peso diario**: La tasa de crecimiento de los bovinos es uno de los rasgos más seleccionados en programas de mejora genética. Está influenciada por la genética, el manejo y la nutrición.

- **Eficiencia en la conversión alimenticia**: Determina cuántos kilogramos de alimento se requieren para ganar un kilogramo de peso corporal. Mejores valores de conversión significan mayor rentabilidad para los productores.
- **Composición de la canal**: Incluye características como el rendimiento en canal, el porcentaje de músculo, grasa y hueso, así como el grado de marmoleo, que impacta la calidad de la carne [13].
- **Resistencia a enfermedades**: Existen genes asociados con la inmunidad y la resistencia a enfermedades como la brucelosis y la tuberculosis, lo que reduce costos de tratamientos veterinarios y mejora el bienestar animal.

El fenotipo de un bovino no solo depende de su genética, sino también del ambiente en el que se desarrolla, los factores como la nutrición, el clima, el manejo y la sanidad afectan la expresión genética. La epigenética también juega un papel clave, ya que modificaciones en la expresión génica pueden ocurrir sin cambios en la secuencia del ADN debido a la influencia ambiental [14].

1.4.3. Técnicas de evaluación genética

La evaluación genética en bovinos de carne ha evolucionado significativamente con el desarrollo de tecnologías moleculares y bioinformáticas, hoy en día, se utilizan múltiples técnicas para identificar, seleccionar y mejorar genéticamente los animales más productivos [15]. Históricamente, la evaluación genética se ha basado en registros productivos y reproductivos de los bovinos, para Montenegro & Hernández (2015) [14] los principales parámetros utilizados incluyen:

- Permiten estimar la tasa de crecimiento del animal.
- Relación entre la cantidad de alimento consumido y el peso ganado.
- Tasa de concepción, intervalo entre partos y longevidad productiva

Si bien estos métodos han sido útiles, presentan limitaciones, ya que la expresión de los rasgos puede estar influenciada por el ambiente y la calidad de los datos recolectados [11].

1.5.PRUEBAS DE PROGENIE

Las pruebas de progenie son otro método tradicional de evaluación genética, consisten en evaluar la descendencia de un toro para determinar su valor genético en base al desempeño de sus crías, si bien es un método confiable, requiere mucho tiempo y es costoso, ya que se necesita evaluar varias generaciones antes de obtener resultados definitivos [12].

1.5.1. Técnicas Genómicas Modernas

Los avances en biotecnología han permitido la aplicación de herramientas genómicas que han revolucionado la selección de bovinos de carne, algunas de las más utilizadas según Montenegro & Hernández (2015) [14] incluyen:

Tabla 2 Técnicas Genómicas Modernas

Técnica Genómica	Descripción	Ventajas	Desventajas
Marcadores de ADN y SNPs	Identificación de variantes genéticas asociadas con características deseables.	Permite selección genética temprana y precisa.	Requiere equipos especializados y análisis bioinformático.
Selección Genómica	Uso de información genética completa para predecir el valor genético de un animal.	Acelera la selección de reproductores sin necesidad de pruebas de progenie.	Costo elevado de implementación.
Técnicas de Edición Genética (CRISPR-Cas9)	Modificación específica de genes en bovinos para mejorar características productivas.	Posibilidad de eliminar enfermedades genéticas y mejorar la eficiencia productiva.	Debate ético y restricciones legales en varios países.

Fuente: [14]

Estas permiten identificar variantes genéticas asociadas con características deseables, como mayor ganancia de peso y resistencia a enfermedades, ya que, utiliza la información genética completa del ADN para predecir el valor genético de un animal con alta precisión. Esto permite seleccionar reproductores jóvenes sin necesidad de esperar su desempeño productivo o el de su progenie [13], al abrir la posibilidad de modificar genes específicos en bovinos para mejorar su resistencia a enfermedades o aumentar la eficiencia productiva.

Tabla 3 Técnicas de evaluación genética en bovinos de carne

Técnica	Principio de Evaluación	Parámetros Analizados	Precisión (%)	Aplicación en Mejoramiento Genético	Limitaciones
BLUP (Best Linear Unbiased Prediction)	Estimación de valores genéticos basados en datos fenotípicos y pedigrí.	Peso al destete, ganancia diaria de peso, conversión alimenticia.	65-85%	Selección de reproductores basados en genealogía y rendimiento.	Requiere datos fenotípicos amplios y precisos.
Selección Genómica (GS)	Uso de marcadores SNPs para predecir el mérito genético.	Valor de Cría Genómico (GEBV), eficiencia alimenticia, calidad de carne.	80-95%	Permite selección temprana sin necesidad de pruebas de progenie.	Costo elevado de genotipado en grandes poblaciones.
Haplotipado y GWAS (Genome-Wide Association Studies)	Identificación de regiones genómicas asociadas con características productivas.	SNPs relacionados con crecimiento, fertilidad, resistencia a enfermedades.	75-90%	Detección de loci favorables para selección asistida por marcadores.	Requiere poblaciones grandes y datos bien estructurados.
Epigenética y Transcriptómica	Análisis de expresión génica y modificaciones epigenéticas.	Metilación del ADN, ARN mensajero (mRNA), regulación génica.	Variable	Evaluación de cómo el ambiente afecta la expresión genética.	Métodos aún en desarrollo para aplicación en selección.

Fuente: [16]

La implementación de estas técnicas ha permitido una mejora sustancial en la eficiencia productiva de bovinos de carne, se ha observado un aumento en la ganancia de peso, mejores índices de conversión alimenticia y una reducción en la incidencia de enfermedades genéticas. Además, la selección genómica ha acelerado los programas de mejora genética, permitiendo obtener resultados en menor tiempo en comparación con los métodos tradicionales [16].

En conclusión, la evaluación genética en bovinos de carne ha evolucionado significativamente con la incorporación de herramientas genómicas, las cuales permiten una selección más precisa y eficiente, si bien aún existen desafíos, como la accesibilidad económica y las regulaciones en la edición genética, estas tecnologías seguirán desempeñando un papel crucial en la mejora de la producción ganadera a nivel mundial [17].

1.6. IMPACTO DE LA CLONACIÓN EN LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS

La clonación de bovinos ha revolucionado la producción de carne, permitiendo la replicación de individuos con alto valor genético, a través de la Transferencia Nuclear de Células Somáticas (SCNT, por sus siglas en inglés) [18]. Sin embargo, el impacto de la clonación en varios parámetros ha sido objeto de estudios debido a las variaciones en el desarrollo embrionario, la epigenética y las condiciones ambientales que pueden afectar la expresión de genes productivos.

La eficiencia de crecimiento en bovinos clonados depende de la selección del donante y de factores ambientales que influyen en la expresión genética, estudios han demostrado que los clones provenientes de toros con alto mérito genético presentan tasas de ganancia de peso superiores en comparación con bovinos obtenidos mediante reproducción convencional [15].

Para Vásquez (2018) [17] los factores que influyen en la ganancia de peso en bovinos clonados son:

- **Calidad del donante**, ya que, los clones de animales con alto desempeño genético tienden a replicar estas características.
- **Eficiencia metabólica**, pues se ha observado que algunos clones tienen una mayor capacidad de conversión alimenticia, lo que mejora el rendimiento productivo
- **Epigenética y reprogramación nuclear**, ya que, las alteraciones epigenéticas en el proceso de clonación pueden afectar el metabolismo del crecimiento [15].

Otro de los aspectos más importantes en la producción de carne bovina es la conversión alimenticia, es decir, la cantidad de alimento requerida para generar un kilogramo de carne, la clonación ha permitido la replicación de bovinos con una eficiencia alimenticia optimizada, lo que reduce los costos de producción y mejora la sostenibilidad de los sistemas ganaderos [19].

1.6.1. Ventajas de la clonación en la conversión alimenticia

- Selección de individuos con mayor eficiencia de conversión de forrajes en masa muscular.
- Posibilidad de replicar animales con mayor digestibilidad y aprovechamiento de nutrientes.
- Reducción del impacto ambiental al disminuir la emisión de gases de efecto invernadero por unidad de carne producida.

Sin embargo, algunos estudios han reportado variabilidad en la eficiencia alimenticia entre clones, lo que sugiere que la expresión genética aún puede ser influenciada por el ambiente y el proceso de clonación mismo [18]. El impacto de la clonación en la calidad de la carne ha sido ampliamente investigado, ya que factores como la terneza, el marmoleo y el color dependen de la genética del animal, los clones de bovinos de razas especializadas en producción cárnica, como Angus o Wagyu, han mostrado perfiles de calidad de carne comparables a los de los donantes originales [16].

No obstante, algunos estudios han indicado que pueden existir diferencias en la maduración muscular de los clones, lo que podría afectar la textura final de la carne en comparación con animales nacidos de reproducción natural [15]. A pesar de las ventajas productivas de la clonación, existen desafíos relacionados con la viabilidad y salud de los clones, se ha observado una mayor incidencia de síndromes asociados al proceso de reprogramación celular, como el **síndrome del ternero grande**, que puede afectar el desarrollo fetal y neonatal [17].

1.6.2. Adaptación de los bovinos clonados a ambientes tropicales

La clonación de bovinos adaptados a estos entornos tropicales busca preservar y replicar individuos con genotipos resistentes a estas condiciones, optimizando el

rendimiento productivo sin comprometer la salud y el bienestar de los animales [18]. Sin embargo, la adaptación de los bovinos clonados a estos ambientes tropicales presenta un desafío importante en la biotecnología reproductiva aplicada a la producción ganadera [20].

1.6.2.1. Factores ambientales que afectan la adaptación

Múltiples factores ambientales pueden influir en el desarrollo y desempeño productivo en ambientes tropicales [19]:

- Las temperaturas elevadas pueden afectar la homeostasis térmica y la eficiencia alimenticia, reduciendo la ganancia de peso y la fertilidad.
- La alta humedad favorece la proliferación de parásitos externos e internos, así como enfermedades bacterianas y virales.
- En climas tropicales, puede verse afectado el desempeño de los clones en función de la variabilidad estacional en la disponibilidad de alimento.
- La exposición prolongada a la radiación solar puede generar estrés oxidativo y afectar la piel y el sistema inmunológico de los bovinos clonados.

Posiblemente entre los desafíos en la adaptación de bovinos clonados a climas tropicales es la capacidad de termorregulación, varias razas clonadas como Nelore y Brahman pueden heredar características de resistencia al calor, como mayor sudoración y menor metabolismo basal [20]. Sin embargo, se han reportado casos en los que la clonación no ha replicado completamente estas adaptaciones, lo que sugiere que la expresión de ciertos genes de resistencia térmica puede estar influenciada por la reprogramación epigenética en la transferencia nuclear [21].

1.6.2.2. Desempeño productivo de bovinos clonados en climas tropicales

El rendimiento productivo de los bovinos clonados en ambientes tropicales depende de su capacidad de conversión alimenticia, crecimiento y eficiencia reproductiva, el éxito de la clonación en ambientes tropicales también depende de la resistencia a enfermedades endémicas de estas regiones, como la fiebre aftosa, la babesiosis y la anaplasmosis [20]. La selección de individuos con mayor inmunidad y su clonación ha permitido mejorar la resistencia del hato en algunos sistemas productivos [22].

En comparación con bovinos convencionales, algunos clones han demostrado una mayor eficiencia en la conversión de forraje de baja calidad en carne, lo que es fundamental en regiones donde la oferta de alimento es variable, asimismo Faber et al. (2023) y Vargas Rodríguez et al. (2007) [7] [22] señalan que, los clones de razas cebuinas presentan tasas de crecimiento similares o superiores a las de sus contrapartes naturales cuando son manejados en sistemas extensivos tropicales.

La clonación ha demostrado ser una herramienta útil para preservar y mejorar la adaptación de bovinos a ambientes tropicales, sin embargo, la expresión fenotípica de ciertos rasgos de adaptación aún puede verse afectada por la reprogramación epigenética y las condiciones ambientales. Por lo tanto, el éxito de la clonación en estas regiones, es seleccionar donantes con características genéticas óptimas, monitorear el desempeño de los clones y aplicar estrategias de manejo que minimicen el impacto del estrés ambiental [20].

1.7.PRODUCCIÓN DE CARNE EN CLIMAS TROPICALES

La producción de carne bovina en climas tropicales se ve influenciada por una serie de factores ambientales y productivos que determinan el desempeño de los sistemas ganaderos [19]. Para garantizar una producción sostenible y rentable se han implementado estrategias basadas en el mejoramiento genético, nutrición especializada y el manejo eficiente del ganado [23].

El estrés térmico es uno de los principales retos en la producción de carne en climas tropicales, se reduce el consumo de alimento y afecta el metabolismo de los bovinos [24]. Además, el cruzamiento entre razas cebuinas y europeas ha demostrado ser una estrategia eficiente para mejorar la calidad de la carne sin comprometer la adaptación al entorno, pues el manejo nutricional también juega un papel clave en la producción cárnica en el trópico, debido a la estacionalidad de los pastos y la variabilidad en la calidad del forraje [25].

Otro factor determinante en la producción de carne en ambientes tropicales es la presencia de enfermedades y parásitos, que pueden afectar la salud y productividad del ganado, la alta humedad favorece la proliferación de garrapatas y la propagación de enfermedades como la babesiosis y la anaplasmosis, lo que hace necesario

establecer programas de control sanitario basados en vacunaciones periódicas y estrategias de manejo integrado [21].

Los sistemas ganaderos en el trópico han evolucionado hacia modelos más sostenibles que combinan biotecnología, manejo ambiental y mejora genética, la inseminación artificial y la transferencia de embriones. El monitoreo remoto y la automatización de procesos ha optimizado la gestión de los recursos, y en términos de eficiencia productiva han permitido acelerar la difusión de genotipos con alto potencial productivo [25].

1.8. TÉCNICAS DE MEJORA GENÉTICA EN BOVINOS

Para optimizar la productividad en base a la calidad de la carne y leche, la mejora genética en bovinos ha sido un proceso fundamental que ha permitido acelerar la selección de individuos con características superiores, mejorando la rentabilidad del sector ganadero [26]. Estas herramientas técnicas abarcan desde métodos tradicionales de baja complejidad, como la selección artificial y la inseminación artificial (IA), hasta tecnologías de alta complejidad avanzadas como la transferencia de embriones (TE), la clonación y la edición genética mediante CRISPR/Cas9 [27].

1.8.1. Selección Genética y Programas de Mejoramiento

La selección genética ha sido la base de la mejora en bovinos, esta se basa en la identificación y reproducción de individuos con características deseables. Este proceso se realizaba mediante el fenotipo, pero la incorporación de la evaluación genómica ha permitido una selección más precisa y eficiente. Actualmente, los programas de mejora genética utilizan pruebas de progenie, índices de selección y marcadores moleculares para optimizar la toma de decisiones reproductivas [25].

Tabla 4 *Técnicas de mejora genética en bovinos*

Técnica	Tasa de Éxito (%)	Incremento en la Eficiencia Productiva (%)	Costo Aproximado por Animal (USD)	Tiempo para Resultados Genéticos
Selección Genética Tradicional	85-95% (en base a generaciones)	10-20% por generación	Bajo ($50-$200 por evaluación genética)	4-5 años
Inseminación Artificial (IA)	60-75% por ciclo estral	20-30% en productividad lechera y cárnica	Moderado ($20-$100 por dosis de semen)	2-3 años
Transferencia de Embriones (TE)	40-50% por embrión transferido	30-50% en mejora genética por generación	Alto ($200-$500 por embrión)	1-2 años
Clonación (SCNT)	5-20% por embrión implantado	50-90% en replicación de genética superior	Muy alto ($15,000-$100,000 por clon)	Inmediato (1 generación)
Edición Genética (CRISPR-Cas9)	80-90% en precisión de edición	50-70% en resistencia a enfermedades y eficiencia alimenticia	Muy alto ($5,000-$50,000 por modificación genética)	1-2 años

Fuente: [25]

1.8.2. Inseminación Artificial (IA)

La IA es una de las técnicas más utilizadas en la mejora genética, permitiendo la diseminación de material genético de toros superiores a gran escala, sus ventajas incluyen el control de enfermedades venéreas, el acceso a genética de élite y la optimización del rendimiento reproductivo, esta técnica ha sido complementada con tecnologías como la detección automatizada de celo y la sincronización de la ovulación para mejorar las tasas de preñez [25].

1.8.3. Transferencia de Embriones (TE) y Fertilización In Vitro (FIV)

La transferencia de embriones permite la multiplicación de material genético valioso mediante la recolección y trasplante de embriones de hembras élite a receptoras, su combinación con la fertilización in vitro ha incrementado el número de descendientes por vaca, optimizando la velocidad del mejoramiento genético, en sistemas tropicales, la TE y la FIV han demostrado ser herramientas clave para la introducción de genotipos adaptados a condiciones extremas [26].

1.8.4. Clonación y Edición Genética

La clonación ha permitido la replicación exacta de animales calificados con alto mérito genético, para asegurar la preservación de características productivas y sanitarias deseadas, sin embargo, su elevado costo y consideraciones éticas han limitado su aplicación comercial; por otro lado, la edición genética mediante CRISPR/Cas9 abre nuevas posibilidades en la mejora de varios rasgos de interés como la resistencia a enfermedades y la optimización de la eficiencia alimenticia, aunque su regulación aún es objeto de debate [27].

1.9.BIPARTICIÓN EMBRIONARIA EN BOVINOS

La bipartición embrionaria, también denominada Splitting Embryos, es una biotecnología de reproducción asistida animal cuyo objetivo es la obtención de individuos genéticamente idénticos (gemelos) a partir de un único embrión; su desarrollo se remonta a la segunda mitad del siglo XX [25].

En la década de 1970 en ratones se realizó la primera demostración experimental de la bipartición embrionaria, se demostró que era posible dividir embriones en estadios tempranos de desarrollo y generar individuos viables a partir de las mitades embrionarias [23]. En bovinos en la década de 1980, se realizaron los primeros intentos exitosos de bipartición; la técnica se ha mejorado con el uso de equipos más sofisticados, como micromanipuladores y láseres de corte, optimizando la tasa de éxito en la transferencia de demi-embriones a receptoras [25].

En la ganadería bovina, la bipartición embrionaria ha sido utilizada para aumentar la producción de individuos genéticamente superiores sin la necesidad de obtener más óvulos fecundados, también ha permitido mejorar los programas de

mejoramiento genético en razas productoras de carne y leche, asegurando la multiplicación de animales con alto valor genético, además, ha servido como una herramienta en estudios científicos sobre el desarrollo embrionario, la epigenética y la clonación [27].

1.9.1. Técnicas para la bipartición de embriones en bovinos

La bipartición de embriones se realiza generalmente en embriones en estadios de mórula compacta o blastocisto, alrededor del día 7 de desarrollo, para llevar a cabo la bipartición, se utilizan equipos especializados que incluyen lupas, micropipetas de vidrio (de corte y de sostén), micromanipuladores y microbisturíes [27]. El proceso se realiza bajo condiciones estériles y controladas, donde el embrión es sostenido y seccionado cuidadosamente para garantizar que cada mitad contenga una porción adecuada de células necesarias para el desarrollo completo.

Es importante destacar que la calidad del embrión original influye significativamente en el éxito de la bipartición, embriones de buena o muy buena calidad presentan mayores tasas de éxito en términos de viabilidad y desarrollo de los demi-embriones resultantes [26]. Además, estudios han evaluado la similitud morfológica y la expresión génica de los demi-embriones hasta el día 13 de desarrollo *in vitro*, encontrando que la bipartición de blastocistos de 8 días produce demi-embriones semejantes hasta el día 10; sin embargo, los patrones de expresión génica pueden variar al día 13 de desarrollo *in vitro*.

La bipartición embrionaria ofrece ventajas como la posibilidad de planificar la producción de gemelos idénticos y aumentar la eficiencia de los programas de transferencia de embriones, sin embargo, también presenta desafíos, como la necesidad de personal altamente calificado y una organización compleja para su implementación exitosa. Incorporar estos aspectos en el marco teórico de tu tesis proporcionará una comprensión más completa de las técnicas de clonación embrionaria y su impacto en los parámetros genómicos productivos en bovinos de carne, especialmente en condiciones de ambiente tropical [27].

1.9.2. Análisis genómico

En la ganadería bovina, la bipartición embrionaria ha sido utilizada para aumentar la producción de individuos genéticamente superiores sin la necesidad de obtener

más óvulos fecundados, también ha permitido mejorar los programas de mejoramiento genético en razas productoras de carne y leche, asegurando la multiplicación de animales con alto valor genético, además, ha servido como una herramienta en estudios científicos sobre el desarrollo embrionario, la epigenética y la clonación [27].

El análisis genómico es una herramienta fundamental en la evaluación de rasgos reproductivos en el ganado bovino, ya que permite identificar marcadores genéticos asociados a la fertilidad, la eficiencia reproductiva y la capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales, esta disciplina se basa en el estudio del ADN bovino para comprender la herencia de características que influyen en la productividad y la reproducción [28]. En cuanto a sus antecedentes, los primeros estudios de genética en bovinos se centraron en la selección fenotípica y el uso de registros genealógicos, pero con los avances en biotecnología se ha logrado secuenciar el genoma bovino y desarrollar herramientas como los microarrays de ADN y la secuenciación de nueva generación (NGS), estas técnicas han permitido la identificación de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) asociados a rasgos reproductivos, como la tasa de concepción, la longevidad reproductiva y la calidad del semen en toros [29].

En cuanto a sus aplicaciones, el análisis genómico es ampliamente utilizado en programas de selección genética para mejorar la eficiencia reproductiva del ganado, reducir la incidencia de enfermedades hereditarias y optimizar la producción de embriones mediante fertilización in vitro y transferencia embrionaria [29]. También se ha empleado para evaluar la influencia de la genética en la adaptación a climas extremos, un factor clave en la producción de carne en regiones tropicales.

1.10. EPIGENÉTICA EN EMBRIONES TRANSFERIDOS

La epigenética es el estudio de modificaciones heredables en la expresión génica que no implican cambios en la secuencia del ADN, desempeñando un papel crucial en la regulación del desarrollo embrionario y la adaptación postnatal en bovinos, en embriones transferidos, las modificaciones epigenéticas pueden ser influenciadas por factores ambientales y condiciones de manipulación en procedimientos de reproducción asistida como la fertilización *in vitro* (FIV) y la clonación somática.

Estas modificaciones incluyen la metilación del ADN, modificaciones en histonas y la regulación por ARN no codificantes [29].

Uno de los principales desafíos en la transferencia de embriones es la reprogramación epigenética, proceso mediante el cual el embrión borra marcas epigenéticas previas y establece nuevas regulaciones en función del ambiente uterino de la madre receptora, estudios han demostrado que embriones generados por clonación o FIV presentan alteraciones en la metilación del ADN en genes clave como IGF2, H19 y OCT4, lo que puede comprometer la viabilidad embrionaria y la eficiencia de implantación [28].

El impacto epigenético en embriones transferidos puede manifestarse en el desarrollo postnatal, con efectos sobre el crecimiento, eficiencia alimenticia y predisposición a enfermedades metabólicas, por ello, el estudio de la epigenética aplicada en embriones bovinos es fundamental para optimizar las biotecnologías reproductivas y mejorar la eficiencia productiva en sistemas ganaderos [29].

La expresión génica en embriones bovinos es un factor determinante en la eficiencia del desarrollo embrionario, implantación y desempeño productivo en la vida adulta, durante las primeras etapas del desarrollo, se activan genes esenciales para la diferenciación celular, metabolismo energético y morfogénesis [29]. Se ha identificado que la regulación de genes como *IGF1*, *GHR*, *LEP* y *PPARγ* está directamente relacionada con parámetros productivos como el crecimiento, conversión alimenticia y calidad de la carne en bovinos de carne (*Bos taurus*), la manipulación embrionaria en técnicas como la FIV o la clonación puede alterar la expresión de estos genes, impactando la eficiencia reproductiva y el rendimiento productivo en la descendencia [30].

Tabla 5 Principales genes asociados con la productividad en bovinos

Gen	**Función Principal**	**Impacto en Parámetros Productivos**
IGF1	Regulación del crecimiento y metabolismo celular.	Mayor tasa de crecimiento y eficiencia alimenticia.
GHR	Receptor de la hormona de crecimiento.	Afecta el desarrollo muscular y la producción de carne.
LEP	Regulación del metabolismo energético y homeostasis.	Influye en la deposición de grasa y la conversión alimenticia.
PPARγ	Diferenciación adipogénica.	Relacionado con la calidad de la carne y contenido graso intramuscular.

Fuente: [30]

Los estudios transcriptómicos han demostrado que embriones producidos in vitro pueden presentar alteraciones en la expresión de estos genes, afectando su viabilidad y potencial de desarrollo, estas diferencias pueden ser consecuencia del ambiente de cultivo, estrés oxidativo o alteraciones epigenéticas inducidas durante la manipulación embrionaria [30].

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación

El estudio se llevó a cabo en la provincia de Morona Santiago, ubicada en la región amazónica de Ecuador, esta provincia limita al norte con la provincia de Pastaza, al sur con Zamora Chinchipe, al este con la República del Perú y al oeste con las provincias de Chimborazo y Azuay. Se caracteriza por su variabilidad geográfica y climática, con territorios que abarcan desde llanuras selváticas hasta zonas montañosas de la cordillera oriental de los Andes.

Las muestras para el presente estudio fueron recolectadas en los cantones de Sucúa, Pablo Sexto, Macas, Huamboya y Sinaí, los cuales presentan condiciones ecológicas diferenciadas que pueden influir en el desarrollo y productividad del ganado bovino.

- **Sucúa:** Ubicado en el centro de la provincia, con un relieve de valles interandinos y una economía basada en la ganadería y agricultura.
- **Pablo Sexto:** Pequeño cantón caracterizado por su vegetación selvática y su clima húmedo, con presencia de pastizales aptos para la cría de bovinos.
- **Macas:** Capital de Morona Santiago, con una economía diversificada que incluye la ganadería, el comercio y la producción agrícola.
- **Huamboya:** Zona con una fuerte influencia de comunidades indígenas shuar, donde la cría de ganado bovino se combina con prácticas agroforestales.
- **Sinaí:** Caracterizado por su topografía irregular y su acceso limitado, lo que condiciona el manejo ganadero y la productividad de los sistemas pecuarios.

Esta diversidad geográfica y productiva permite un análisis representativo del impacto de la clonación de embriones en el rendimiento productivo del ganado bovino en condiciones tropicales.

La altitud es un factor clave en la producción bovina, ya que influye en la fisiología del animal, la adaptación al ambiente y la productividad, en la provincia de Morona Santiago, los cantones analizados presentan altitudes que varían significativamente: Sucúa entre 900 y 1.200 m.s.n.m., Pablo Sexto entre 600 y 800 m.s.n.m., Macas entre 950 y 1.050 m.s.n.m., Huamboya entre 1.000 y 1.300 m.s.n.m., y Sinaí entre 750 y 900 m.s.n.m. Las altitudes moderadas en estos cantones permiten una producción bovina eficiente, con temperaturas cálidas y una disponibilidad de pastizales adecuada para la ganadería extensiva [31].

2.1.2. Pluviosidad

La pluviosidad es un factor determinante en la producción bovina, ya que afecta la calidad de los pastos, la disponibilidad de agua y las condiciones sanitarias del ganado, la provincia de Morona Santiago presenta un régimen pluviométrico caracterizado por precipitaciones abundantes durante la mayor parte del año.

Los valores promedio de precipitación en los cantones seleccionados varían entre los 2.000 y 4.000 mm anuales, con distribución heterogénea a lo largo del año, en términos generales, los meses más lluviosos corresponden a marzo, abril y mayo, mientras que los periodos con menor precipitación se registran entre septiembre y noviembre [31].

2.2. Tipo de investigación

La investigación desarrollada en este trabajo corresponde a un estudio experimental con enfoque cuantitativo, que buscó evaluar el impacto de la clonación de embriones en los parámetros genómicos productivos de los bovinos de carne (*Bos taurus*) mantenidos en un ambiente tropical, el objetivo principal fue determinar la viabilidad, eficiencia y potencial de la clonación como herramienta biotecnológica para mejorar la productividad de la ganadería bovina en condiciones climáticas adversas. A través de un diseño experimental controlado, se evaluaron tanto los efectos de la clonación sobre la productividad de los bovinos como las variaciones genéticas asociadas a los procesos de superovulación y bipartición embrionaria.

2.3. Diseño de la investigación

El diseño de la investigación se estructuró como un estudio longitudinal, en el que se realizó un seguimiento de los animales durante las diferentes fases de la biotecnología reproductiva (superovulación, colecta de embriones, bipartición, transferencia y diagnóstico de gestación). El diseño incluyó grupos experimentales, conformados por bovinos clonados (bipartición) y controles (embrión completo), para comparar los efectos genómicos productivos derivados del uso de estas tecnologías; la selección de animales se realizó bajo criterios específicos relacionados con la raza, salud y condiciones fisiológicas, garantizando que los resultados sean representativos y comparables.

Tabla 6 Diseño experimental para el análisis genómico en embriones bovinos bipartidos y completos

Grupo experimental	**Tipo de embrión**	**Tratamiento aplicado**	**Número de embriones (n)**	**Etapa de análisis**	**Variables genómicas evaluadas**
Grupo 1	Bipartido	Bipartición embrionaria in vitro	32	Estadío de blastocisto	SNPs: CSN2, CSN3, GH1, GHR, PAEP, ABCG2
Grupo 2	Completo	Sin miromanipulación (control)	22	Estadío de blastocisto	SNPs: CSN2, CSN3, GH1, GHR, PAEP, ABCG2

Fuente: Elaboración Propia.

La tabla presenta la estructura del diseño experimental utilizado para evaluar el impacto de la clonación embrionaria sobre parámetros genómicos en bovinos de carne (*Bos taurus*), bajo condiciones ambientales tropicales. Se compararon dos grupos: embriones bipartidos (clonados) y embriones completos (no

micromanipulados), ambos en estadio de blastocisto. Se analizaron frecuencias genotípicas en genes funcionales relevantes para la producción y reproducción bovina.

2.4. Método de investigación

El método utilizado en esta investigación se basa en una combinación de procedimientos in vivo e in vitro para la obtención, manipulación y transferencia de embriones, así como en técnicas avanzadas de biología molecular para el análisis genético.

2.4.1. Técnicas utilizadas

2.4.1.1. Selección de donantes de embriones

La selección de vacas donantes es fundamental para el éxito de los programas de clonación y transferencia embrionaria, se eligieron hembras de la raza Charolais, reconocidas por su alta calidad genética y características productivas superiores en la producción de carne.

Los criterios de selección incluyeron:

- Vacas adultas, entre 3 y 7 años, en óptimas condiciones de salud y con historial reproductivo favorable.
- Se seleccionaron animales con una condición corporal entre 3 y 4 en una escala de 1 a 5, asegurando reservas energéticas adecuadas para la superovulación y la colecta de embriones.
- Animales libres de enfermedades infecciosas y parasitarias, con vacunaciones y desparasitaciones al día acorde a la región.

2.4.1.2. Selección de receptoras de embriones

Las vacas receptoras desempeñan un papel crucial en la gestación y desarrollo de los embriones transferidos.

Se seleccionaron hembras mestizas con las siguientes características:

- Las receptoras fueron sincronizadas para coincidir con el estado del embrión a transferir, utilizando protocolos hormonales estándar.

- Similar a las donantes, con una condición corporal adecuada y libres de patologías que pudieran afectar la gestación.

2.4.1.3. Protocolo de superovulación

El protocolo de superovulación consistió en la administración de hormonas gonadotrópicas para estimular el desarrollo múltiple de folículos ováricos, se utilizó BSCRFSH recombinante, administrado en dosis decrecientes durante un periodo de 4 días, seguido de una inyección de prostaglandina para inducir la luteólisis y sincronizar la ovulación de acuerdo al protocolo de Bovenhuis (2015) [30].

2.4.1.4. Colecta de embriones

La colecta de embriones se realizó en el día 7 post celo e inseminación artificial, mediante lavado uterino no quirúrgico, se utilizó una solución de fosfato bufferizado estéril calentada a 24°C, introducida en el útero y recuperada por gravedad, los embriones fueron identificados y clasificados bajo estereomicroscopio según su morfología y estadio de desarrollo [32].

2.4.1.4. Clasificación de embriones

Los embriones se clasificaron de acuerdo con las pautas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, evaluando su morfología y estado de desarrollo de acuerdo con Caroli et al. (2009) [32]:

- Masa celular compacta sin cavitación evidente.
- Inicio de formación de cavidad con fluido (blastocele).
- Cavidad bien definida con diferenciación de trofoblasto y masa celular interna.
- Aumento de diámetro embrionario con zona pelúcida adelgazada.
- Embrión libre de la zona pelúcida o en proceso de eclosión.

Solo los embriones de calidad excelente y buena (Grado 1) en estado de mórula compacta a blastocisto fueron seleccionados para la bipartición y transferencia, asegurando altas tasas de preñez y desarrollo fetal adecuado según [8] [32].

2.4.1.5. Método de bipartición de embriones (Splitting Embryo)

La bipartición embrionaria se llevó a cabo en condiciones estériles bajo un estereomicroscopio.

El procedimiento incluyó:

- Utilizando un microscopio invertido Olympus anexo a un micromanipulador Joistick ABtecnology el embrión fue fijado en solución Splitting embryos ABT en posición adecuada en una placa petrick p60mm.
- Con una microcuchilla, se realizó una incisión precisa a lo largo del eje meridional, dividiendo el embrión en dos mitades iguales, cada una conteniendo una porción de la masa celular interna y del trofoblasto siendo mórula o blastocisto respectivamente.
- Las mitades resultantes fueron cultivadas en medio Holding plus específico durante ½ hora para evaluar su viabilidad y capacidad de reexpansión antes de la transferencia.

2.4.1.6. Transferencia de embriones

Los demi-embriones viables fueron transferidos a las receptoras sincronizadas (protocolo IATF) según Comin et al. (2008) [34] y transferidas mediante técnica no quirúrgica de González (2008) [35]:

- Asepsia de la región perineal y sedación ligera del tren posterior mediante la aplicación de lidocaína al 2% (anestesia local epidural sacro-coccígea).
- Introducción de un catéter IMV para transferencia de embriones 0,25 cc a través del cérvix hasta el cuerno uterino ipsilateral al ovario con cuerpo lúteo funcional.
- Liberación suave del demi-embrion en la luz uterotubárica, minimizando el trauma y asegurando su correcta posición para la implantación.

2.4.1.7. Diagnóstico de gestación

El diagnóstico de gestación se realizó mediante ultrasonografía transrectal a los 30 y 60 días post-transferencia, evaluando la presencia de vesícula embrionaria, frecuencia cardíaca fetal y desarrollo adecuado según la edad gestacional.

2.4.1.8. Análisis genómico

Para el análisis genómico, se recolectaron muestras de folículos pilosos de los terneros nacidos (60 folículos pilosos de la cola del animal), el ADN fue extraído utilizando kits comerciales estándar y cuantificado por espectrofotometría [34]. Se llevó a cabo la secuenciación de genes asociados a características productivas y de calidad de leche, enfocándose en polimorfismos de nucleótido único (SNPs).

Extracción de ADN y Tipificación genes de Interés Comercial

La extracción de ADN se realizó a partir de folículos pilosos por metodología de perlas magnéticas empleando el kit MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit de la casa comercial Applied Biosystems™ siguiendo las recomendaciones del fabricante [35]. Una vez realizada la extracción se evaluó la concentración y pureza de la muestra mediante espectrofotometría por el equipo nanodrop lite [36]. Posterior a la extracción y cuantificación de ADN de calidad, se procedió a realizar la genotipificación de las muestras de los ejemplares usando los chips Axiom™ Bovine Genotyping v3 Array de ThermoFisher que contiene SNPs 63000, el Axiom™ Bovine Genotyping 100K Array que contiene 100.000 SNPs o un chip de similares características, mediante el uso del equipo GeneTitan™ MC Scan Instrument [36]. El procesamiento de los datos producto de la genotipificación fue realizada de acuerdo a las sugerencias del fabricante del arreglo, usando el programa Axiom™ Analysis Suite [35].

Análisis bioinformático:

La metodología de análisis bioinformático para el chip de alta densidad en bovinos se implementó inicialmente a través del software Thermo Fisher Axiom Analysis Suite(V4.0.3.3) (Disponible en: https://downloads.thermofisher.com/Axiom_Analysis/610574_AxAS_5.3_Build45.zip) implementado sobre un despliegue de máquina virtual alojado en el bucket de Biotecgen SAS para Google Cloud Platform y usando el genoma de referencia ARS_UCD1.2 (bosTau9, NCBI). Analíticamente, se realizó la preparación de los datos a través de la importación de microarrays en formato CEL para el cálculo de métricas DishQC, QC rates y Plate Quality [36]. A partir de dichas métricas, se realizó el llamado de genotipos asignando los datos a alelos conocidos, el análisis

de variantes, permitió identificar y filtrar eventos tales como SNPs, inserciones y deleciones (indels) [38].

2.4.1.9. Investigación de polimorfismos en genes asociados a rasgos productivos

Tabla 7 Polimorfismos en genes asociados a rasgos productivos

Polimorfismo Genético	Gen Asociado	Variantes Identificadas	Rasgo Productivo Asociado	Impacto o Relevancia
β-caseína (CSN2)	CSN2_245	A1 y A2	Variante de la proteína β-caseína, con posibles beneficios para la salud humana. A2/A2: Leche A2; A2/A1: Portador de leche A2; A1/A1: Leche A1	El individuo posee cero (A1A1), una (A1A2), o dos copias (A2A2), del alelo favorable respectivamente. NA alelos no determinados.
β-caseína (CSN2)	CSN2_411	Variante CSN2_411	Proteína asociada a mejor producción de queso. Genotipo BB es el más deseable. Las vacas con genotipos BB y AB no pueden ser A2/A2.)	El individuo posee cero (AA), una (AB), o dos copias (BB), del alelo favorable respectivamente. NA alelos no determinados
Transportador ABCG2	ABCG2	SNPs en ABCG2	Producción de leche y eficiencia en la secreción de componentes lácteos	Los SNPs en el gen ABCG2 están relacionados con la mayor eficiencia en la secreción de componentes lácteos, contribuyendo a la productividad de la leche.
GH1	GH1_2291	0	El gen de la hormona del crecimiento bovina,	El individuo posee cero (0); una (1) ; o dos copias (2) , del alelo favorable

			desempeña una importante función en la lactancia y procesos de crecimiento. El alelo favorable está asociado con una mayor producción de grasa láctea y porcentaje de proteína.	respectivamente. NA alelo no determinado
GHR	GHR_F279Y	1	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. NA alelo no determinado
k CASEÍNA	CSN3_470	AB	El genotipo BB se asocia con un mayor porcentaje y rendimiento de proteína y grasa, aumentos en los niveles de la caseína menor tiempo de coagulación, mejorando así la calidad de la leche. Los genotipos AB y BE son intermedios; AA, AE y EE son menos favorables. La	El individuo posee cero (AA); una (AB); o dos copias (BB), del alelo favorable respectivamente. NA alelo no determinado

			variante EE no es deseable pues produce una proteína que no sirve para hacer queso.	
β-LACTOGLOBULINA	PAEP_181	BB	El alelo B para los SNPs del gen PAEP, resulta ser más favorable en los procesos de coagulación del cuajo y la calidad de la leche para la producción de queso	El genotipo BB se asocia con un mayor porcentaje y rendimiento de proteína y grasa, aumentos en los niveles de la caseína menor tiempo de coagulación, mejorando así la calidad de la leche. Los genotipos AB y BE son intermedios; AA, AE y EE son menos favorables. La variante EE no es deseable pues produce una proteína que no sirve para hacer queso.
β-LACTOGLOBULINA	PAEP_225	BB	El alelo B para los SNPs del gen PAEP, resulta ser más favorable en los procesos de coagulación del cuajo y la calidad de la leche para la producción de queso	El genotipo BB se asocia con un mayor porcentaje y rendimiento de proteína y grasa, aumentos en los niveles de la caseína menor tiempo de coagulación, mejorando así la calidad de la leche. Los genotipos AB y BE son intermedios; AA, AE y EE son menos favorables. La variante EE no es deseable pues produce una proteína que no sirve para hacer queso.

β-LACTOGLOBULINA	PAEP_239	AB	El alelo B para los SNPs del gen PAEP, resulta ser más favorable en los procesos de coagulación del cuajo y la calidad de la leche para la producción de queso	El genotipo BB se asocia con un mayor porcentaje y rendimiento de proteína y grasa, aumentos en los niveles de la caseína menor tiempo de coagulación, mejorando así la calidad de la leche. Los genotipos AB y BE son intermedios; AA, AE y EE son menos favorables. La variante EE no es deseable pues produce una proteína que no sirve para hacer queso.
β-LACTOGLOBULINA	PAEP_312	AB	El alelo B para los SNPs del gen PAEP, resulta ser más favorable en los procesos de coagulación del cuajo y la calidad de la leche para la producción de queso	El genotipo BB se asocia con un mayor porcentaje y rendimiento de proteína y grasa, aumentos en los niveles de la caseína menor tiempo de coagulación, mejorando así la calidad de la leche. Los genotipos AB y BE son intermedios; AA, AE y EE son menos favorables. La variante EE no es deseable pues produce una proteína que no sirve para hacer queso.

Fuente: Elaboración propia [29]

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 resultados obtenidos en esta investigación se llevó a cabo utilizando herramientas estadísticas avanzadas y técnicas bioinformáticas, con el objetivo de evaluar la relación entre los polimorfismos genéticos identificados y los parámetros productivos en los bovinos clonados bajo condiciones tropicales.

Para el análisis genético, se emplearon secuencias de ADN obtenidas de los folículos pilosos de los animales clonados, los polimorfismos fueron identificados mediante técnicas de secuenciación de ADN, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de la secuenciación de Sanger o tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS), lo que permitió la detección precisa de variantes en genes clave relacionados con la calidad de la leche y la eficiencia productiva.

Para el análisis de los polimorfismos específicos, las variantes y genes, se utilizó software especializado para realizar la genotipificación, que permitió identificar el genotipo de cada animal en relación con estas variantes, los resultados fueron analizados para correlacionar los genotipos con los datos productivos, como la cantidad de leche producida, la calidad de la leche y las características tecnológicas de la leche en rendimientos.

El procesamiento de los datos estadísticos incluyó el uso de herramientas como SPSS o R, que permitieron realizar análisis de varianza (ANOVA), regresión lineal y pruebas de significancia para determinar las diferencias entre los grupos de animales clonados y los no clonados [39]. Los resultados mostraron la influencia de los polimorfismos genéticos en los rasgos productivos, lo que refuerza la viabilidad de la clonación en la mejora de la productividad en condiciones tropicales.

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.

Tabla 8 Frecuencia relativa de genotipos por SNP funcional en embriones bovinos bipartidos y completos (Bos taurus).

SNP-GEN	Tipo embrión	GENOTIPO/N COPIAS		
		A1= A1/A1	A2=A1/A2	A3=A2/A2
CSN2_245	Bipartido	6/32 (18.75)aA	14/32 (43.7)bA	12/32 (37.5)bA
	Completo	2/22 (9.09)aA	8/22 (36.36)bA	12/22 (54.54)bA
		AA	AB	BB
CSN2_411	Bipartido	4/32 (12.5)aA	10/32 (31.25)bA	18/32 (56.25)cA
	Completo	2/22 (9.09)aA	8/22 (36.36)bA	12/22 (54.54)bA
		0	1	2
ABCG2	Bipartido	0/32 (0)aA	0/32 (0)aA	32/32 (100)bA
	Completo	0/22 (0)aA	0/22 (0)aA	22/22 (100)bA
		0	1	2
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
		0	1	2
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
		AA	AB	BB
CSN3_470	Bipartido	8/32 (25)aA	16/32 (50)bA	8 (25)aA
	Completo	2/22 (9.09)aB	12/22 (54.54)bA	8/22 (36.36)bA
		AA	AB	BB
PAEP_181	Bipartido	0/32 (0)aA	0/32 (0)aA	32/32 (100)bA
	Completo	0/22 (0)aA	0/22 (0)aA	22/22 (100)bA
		AA	AB	BB
PAEP_225	Bipartido	0/32 (0)aA	0/32 (0)aA	32/32 (100)bA
	Completo	0/22 (0)aA	3/22 (13.63)bB	19/22 (86.36)cA
		AA	AB	BB
PAEP_239	Bipartido	14/32 (43.75)aA	18/32 (56.25)aA	0/32 (0)bA
	Completo	9/22 (40.9)aA	10/22 (45.45)aA	3/22 (13.63)bB
		AA	AB	BB
PAEP_312	Bipartido	14/32 (43.75)aA	18/32 (56.25)aA	0/32 (0)bA
	Completo	8/22 (36.36)abA	11/22 (50)aA	3/22 (13.63)bB

AA,AB,BB = genotipo; 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

En la Tabla 8 se presentan los Genes analizados y su función: CSN2_245 (β-caseína A2): Variante de la proteína β-caseína. A2/A2 se asocia a leche A2, de potencial beneficio digestivo. CSN2_411 (β-caseína AB): Variante de β-caseína; el genotipo BB se asocia con mejor capacidad de cuajado para producción de queso. ABCG2: Gen relacionado con secreción de grasa y proteína en leche.

El número representa la cantidad de copias del alelo favorable (0, 1, 2). GH1_2291: Gen de la hormona del crecimiento. Las copias (0, 1, 2) indican la cantidad de alelos favorables para producción lechera. GHR_F279Y: Receptor de hormona del crecimiento. Genotipo asociado con producción de leche y proteína. CSN3_470 (κ-caseína): Gen importante para la cuajada de la leche. El genotipo BB mejora la eficiencia quesera. PAEP_181 / PAEP_225 / PAEP_239 / PAEP_312: Polimorfismos del gen PAEP (proteína principal de la leche). El genotipo BB se asocia con mayor contenido proteico en la leche. Letras minúsculas (a, b, c) indican diferencias significativas entre genotipos dentro del mismo tipo de embrión. Letras mayúsculas (A, B) indican diferencias significativas entre tipo de embrión (bipartido vs. completo) para un mismo genotipo.

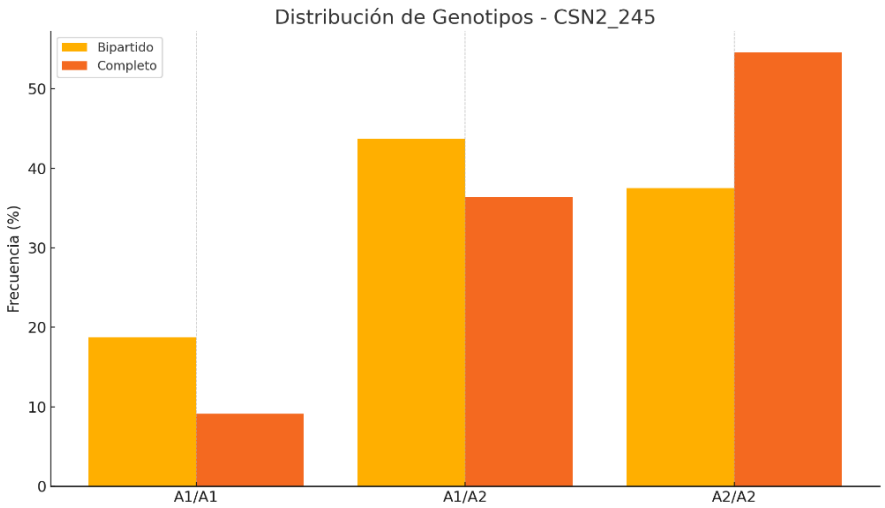


Figura 1 Distribución de genotipos del SNP CSN2_245 (β-caseína A2)

Comparación de frecuencias genotípicas entre embriones bipartidos y completos en el SNP CSN2_245. Se muestra la frecuencia relativa (%) de los genotipos A1/A1, A1/A2 y A2/A2 en embriones bipartidos y completos. Este gen está asociado con la producción de leche A2, de interés nutricional.

Fuente: Elaboración propia

Este gen presenta tres genotipos: A1/A1, A1/A2 y A2/A2. No se observaron diferencias significativas entre los tipos de embrión (A). Sin embargo, dentro de cada grupo, el genotipo A1/A1 (leche tipo A1) presentó una menor frecuencia que A1/A2 y A2/A2, lo cual sugiere una mayor proporción de animales portadores o productores de leche A2. Este perfil genético es relevante dado el interés creciente en leche A2 por sus beneficios digestivos potenciales en humanos. No se encontraron diferencias significativas entre embriones bipartidos y completos.

Los resultados muestran una mayor frecuencia de genotipos A1/A2 y A2/A2 en ambos tipos de embrión, sin diferencias significativas entre bipartidos y completos. Esto indica una prevalencia del alelo A2, asociado a leche potencialmente más digestiva y con menor respuesta inflamatoria en humanos [38]. Estudios similares en poblaciones Holstein y Jersey han reportado proporciones elevadas de alelos A2, favorecidos por consumidores que demandan leche A2 por su perfil funcional [40] los resultados están en línea con estas tendencias, evidenciando una reserva genética favorable en ambas líneas embrionarias.

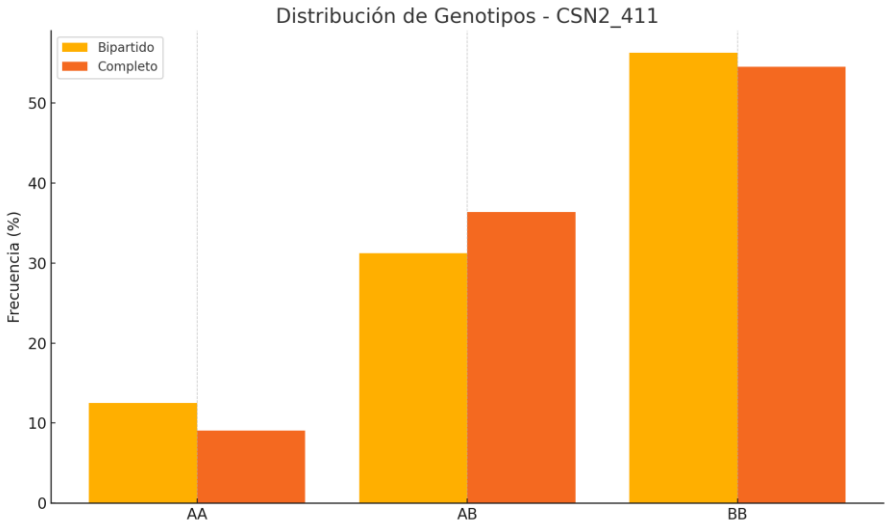


Figura 2 Distribución de genotipos del SNP CSN2_411 (β-caseína AB)

Comparación de frecuencias genotípicas entre embriones bipartidos y completos en el SNP CSN2_411. Se muestra las frecuencias para genotipos AA, AB y BB. El genotipo BB está relacionado con mejor aptitud para la producción de queso.

Fuente: Elaboración propia

El genotipo BB, deseable para la producción de queso, fue más frecuente en ambos tipos de embriones. Se encontraron diferencias significativas entre los genotipos dentro del grupo bipartido ($a \neq b \neq c$), pero no entre tipos de embrión (A). Esto indica una alta proporción de animales con el alelo favorable para transformación láctea. No se observan diferencias significativas entre tipo de embrión.

En este SNP, se encontró una alta frecuencia del genotipo BB, especialmente en embriones bipartidos. Esta variante ha sido asociada con una mejor capacidad para la producción de queso, debido a una mayor precipitación y estabilidad proteica [40]. Los datos coinciden con lo reportado por Ng-Kwai (2017) [42] quienes señalaron que el genotipo BB mejora el rendimiento quesero hasta en un 15% en comparación con A1A1, la ausencia de diferencias entre tipos de embrión sugiere

que esta característica puede ser preservada incluso tras bipartición.

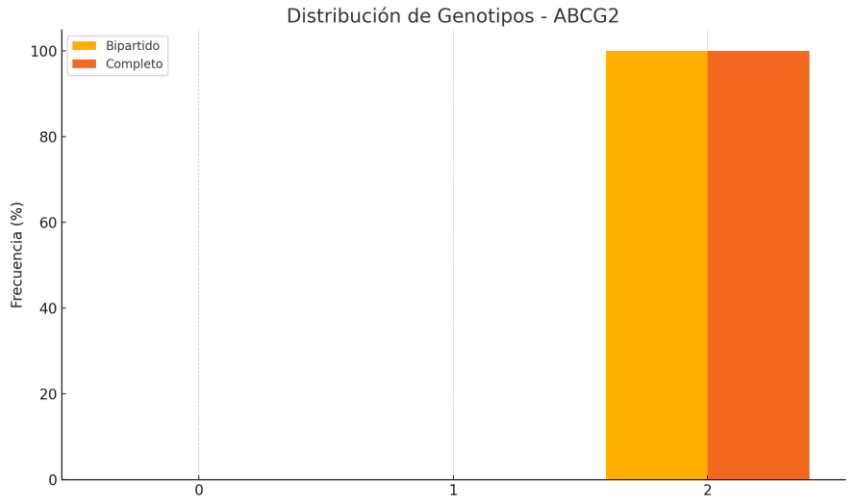


Figura 3 Distribución de copias del alelo (genotipo) favorable en el gen ABCG2

Comparación de frecuencias genotípicas entre embriones bipartidos y completos en el SNP ABCG2. Todos los embriones muestran el genotipo homocigoto favorable (2), relacionado con mayor contenido de grasa y proteína en leche.

Fuente: Elaboración propia

Todos los embriones, tanto bipartidos como completos, presentaron exclusivamente el genotipo con dos copias del alelo favorable (2), con diferencias significativas respecto a los otros genotipos ($a \neq b$) pero sin variación entre tipo de embrión (A). Este perfil sugiere alta capacidad para secreción de grasa y proteínas en la leche. No hay diferencias entre tipo de embrión.

Todos los embriones presentaron el genotipo con dos copias del alelo favorable (2), relacionado con mayor contenido de grasa y proteína en leche [41]. La ausencia de variación genética en este SNP podría atribuirse a una fuerte selección previa o a un cuello de botella genético en la población de donantes.

Estos resultados refuerzan lo hallado por Viitala et al. (2006) [43], quienes demostraron que ABCG2 está positivamente correlacionado con rasgos de calidad láctea, particularmente en líneas seleccionadas para grasa y proteína, los embriones completos mostraron mayor proporción del genotipo heterocigoto (1), con diferencias significativas entre genotipos ($a \neq b$) pero sin diferencias entre tipos de embrión (A). Este patrón sugiere una ligera tendencia hacia perfiles genéticos con

mayor producción de grasa y proteína láctea. No se evidencian diferencias significativas entre tipo de embrión.

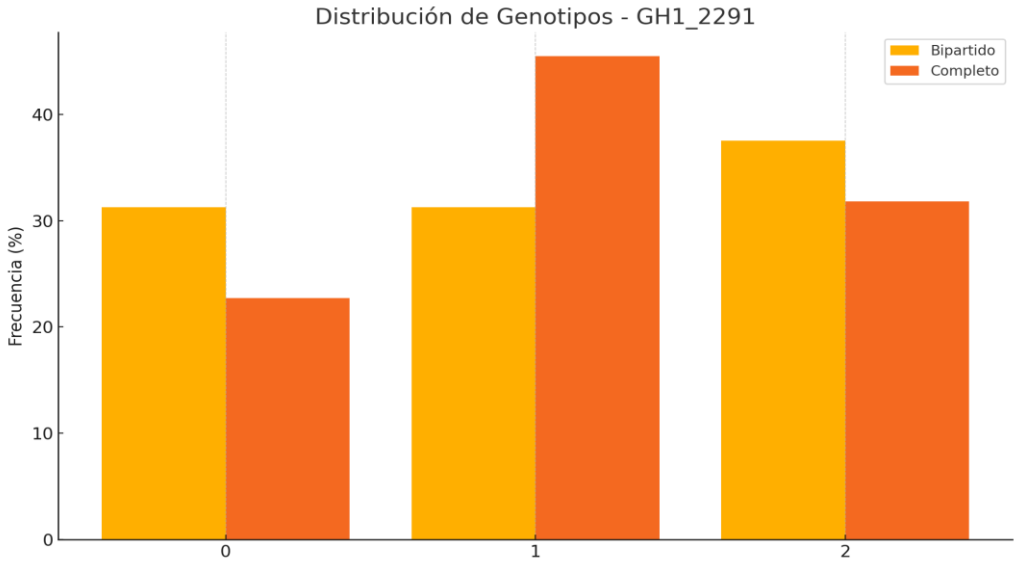


Figura 4 Distribución de copias del alelo (genotipo) favorable en el gen GH1_2291

Comparación de frecuencias genotípicas entre embriones bipartidos y completos en el SNP GH1_2291. Se analizan los genotipos 0, 1 y 2 para el gen de la hormona del crecimiento, con influencia sobre la composición láctea.

Fuente: Elaboración propia.

No se observaron diferencias entre tipos de embrión, aunque hubo variabilidad genotípica interna, el alelo favorable se ha relacionado con mayor secreción de hormona de crecimiento y mejor rendimiento lácteo [42]. Al comparar con datos de Ng-Kwai (2017) [42] se confirma que la distribución de genotipos heterocigotos es común en poblaciones seleccionadas, sugiriendo un posible equilibrio entre producción y eficiencia metabólica.

Este marcador muestra diferencias tanto entre genotipos ($a \neq b \neq c$) como entre tipos de embrión ($A \neq B$). Los embriones completos mostraron una frecuencia significativamente mayor del genotipo heterocigoto (1) y una menor del homocigoto desfavorable (0), lo cual sugiere una mayor potencialidad en producción láctea en este grupo. Se confirma diferencia significativa entre embriones bipartidos y completos.

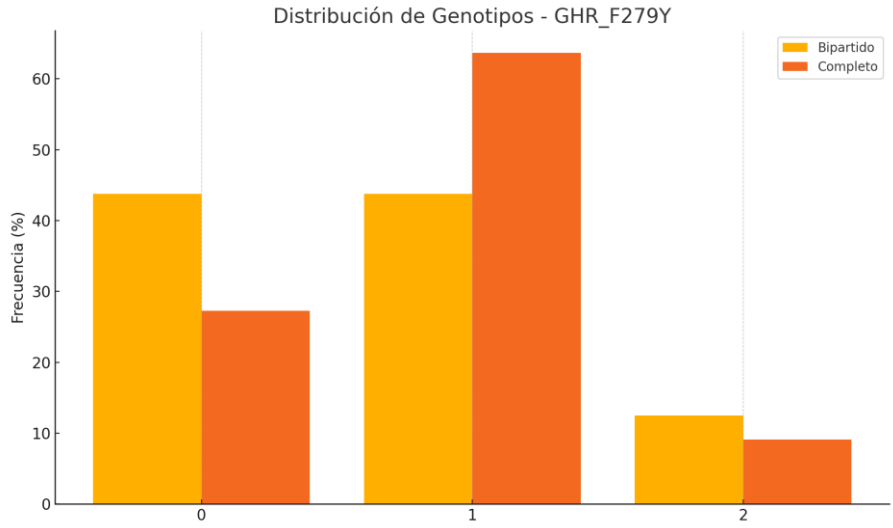


Figura 5 Distribución de copias del alelo (genotipos) favorable en el gen GHR_F279Y

Comparación de frecuencias genotípicas entre embriones bipartidos y completos en el SNP GHR_F279Y. Genotipos 0, 1 y 2, asociados a la respuesta a la hormona del crecimiento y rendimiento lechero.

Fuente: Elaboración propia.

Se observaron diferencias significativas tanto entre genotipos como entre tipos de embrión, siendo los completos los que portan mayor frecuencia del genotipo favorable. Este SNP afecta la señalización de la hormona de crecimiento y está vinculado con una mayor producción de leche [43]. Los resultados se alinean con los hallazgos de Viitala et al. (2006) [43] quienes asociaron el alelo "favorable" con un aumento de rendimiento lechero y eficiencia alimenticia.

En embriones bipartidos, se observó una distribución balanceada, mientras que en completos predominó el genotipo AB y BB, ambos deseables para cuajado. Se presentan diferencias entre genotipos ($a \neq b$) y también entre tipos de embrión ($A \neq B$), indicando una mayor frecuencia de alelos favorables en embriones completos. Diferencia significativa entre tipo de embrión [44].

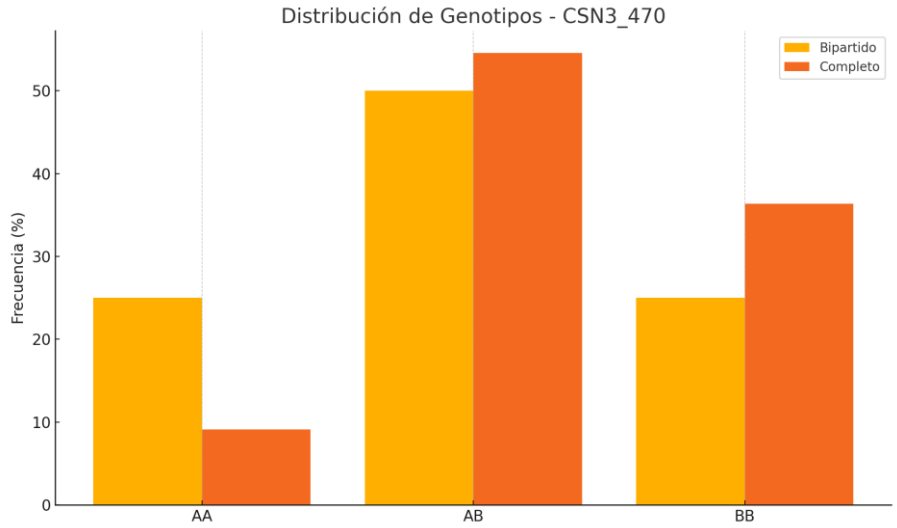


Figura 6 Distribución de genotipos del SNP CSN3_470 (κ-caseína)

Comparación de frecuencias genotípicas entre embriones bipartidos y completos en el SNP CSN3_470. Genotipos AA, AB y BB, vinculados con la calidad tecnológica de la leche, especialmente en procesos de cuajado.

Fuente: Elaboración propia.

El genotipo AB fue predominante en ambos tipos de embrión, con mayor proporción en completos. Este alelo ha sido reportado como favorable para el procesamiento industrial de leche, especialmente en quesería [41]. Además, como indica Viitala et al. (2006) [43], la variante B contribuye a mayor contenido de caseína total. Las diferencias entre tipos de embrión sugieren que la bipartición podría afectar la segregación de este marcador.

En PAEP_181, ambos grupos mostraron exclusivamente el genotipo BB (100%), sin diferencias entre tipos de embrión, en PAEP_225, sí se observaron diferencias entre genotipos (a ≠ b ≠ c) y también entre tipos de embrión (A ≠ B), destacando mayor diversidad alélica en embriones completos. PAEP_181: sin diferencias; PAEP_225: diferencias significativas entre tipo de embrión.

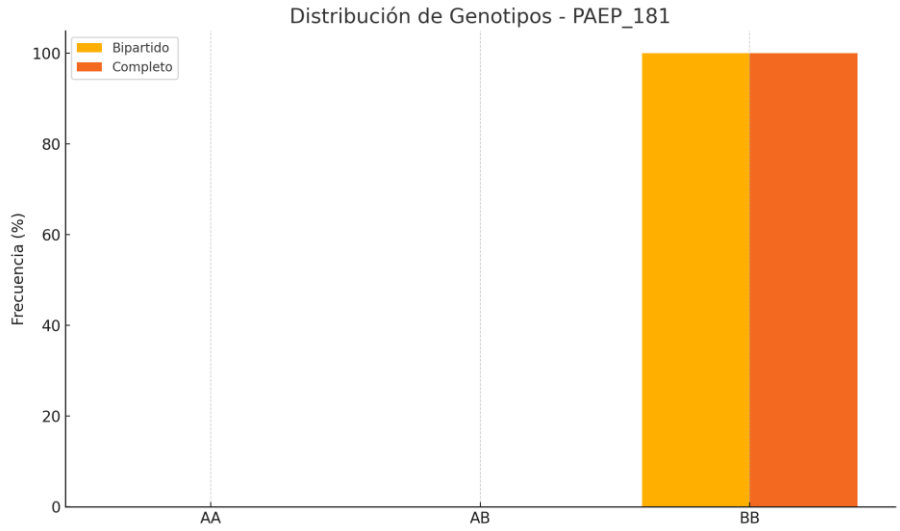


Figura 7 Distribución de genotipos para el SNP PAEP_181

Comparación de frecuencias genotípicas entre embriones bipartidos y completos en el SNP PAEP_181. Todos los embriones presentan el genotipo BB, asociado a una mayor concentración de proteína en leche.

Fuente: Elaboración propia

El genotipo BB fue dominante en PAEP_181 sin diferencias entre grupos, coherente con estudios que vinculan esta variante con mayor contenido de proteína en leche [40]. En PAEP_225, sí hubo diferencias significativas entre genotipos y tipos de embrión, con mayor diversidad alélica en completos. Según Kuss et al. (2005) [40] la variación en PAEP puede estar asociada con cambios en calidad tecnológica de la leche, lo cual explicaría la mayor diversidad en embriones completos como un indicio de mayor variabilidad genética.

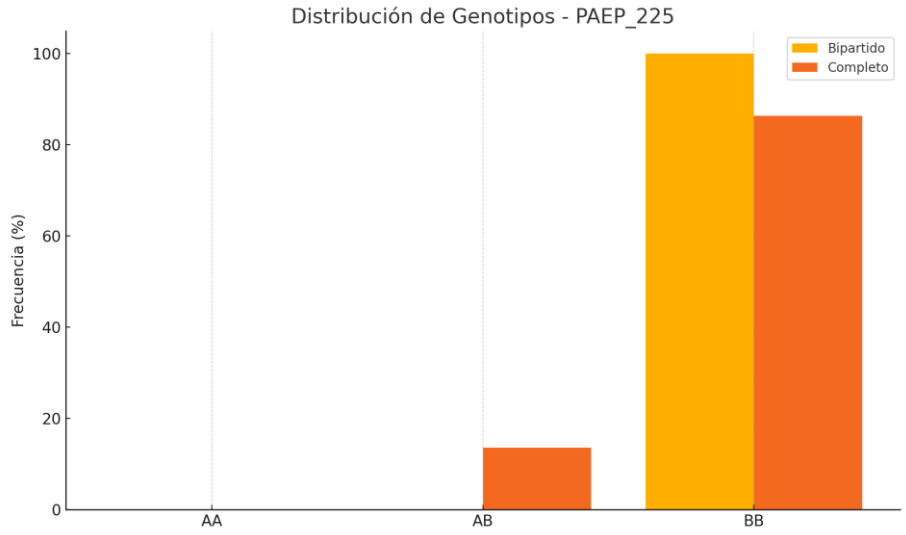


Figura 8 Distribución de genotipos para el SNP PAEP_225

Comparación de frecuencias genotípicas entre embriones bipartidos y completos en el SNP PAEP_225. Frecuencia relativa de los genotipos AA, AB y BB. Se observa mayor variabilidad genética en embriones completos.

Fuente: Elaboración propia

Ambos genes presentan diferencias significativas entre genotipos (a ≠ b). Para PAEP_239, el genotipo BB estuvo ausente en bipartidos y presente en completos, lo que indica diferencia significativa entre tipos de embrión (A ≠ B). En PAEP_312, aunque la distribución es similar, también se evidencia una presencia exclusiva de genotipo BB en embriones completos, indicando posible diferencia entre tipos de embrión. Ambos genes muestran diferencias significativas.

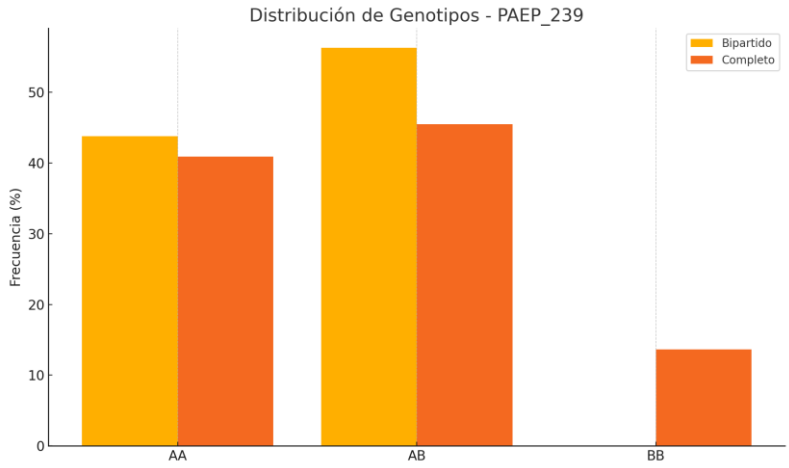


Figura 9 Distribución de genotipos para el SNP PAEP_239

Comparación de frecuencias genotípicas entre embriones bipartidos y completos en el SNP PAEP_239. Genotipos AA, AB y BB vinculados con la síntesis de β-lactoglobulina. El genotipo BB solo está presente en embriones completos.

Fuente: Elaboración propia

Ambos SNPs mostraron presencia del genotipo BB exclusivamente en embriones completos, lo cual sugiere una mejor conservación del alelo favorable. Según Viitala et al. (2006) [43] estas variantes afectan directamente la síntesis de la proteína β-lactoglobulina y están asociadas con mayor concentración de sólidos totales en leche, la ausencia de BB en bipartidos podría atribuirse a la posible pérdida aleatoria de combinaciones alélicas durante la bipartición.

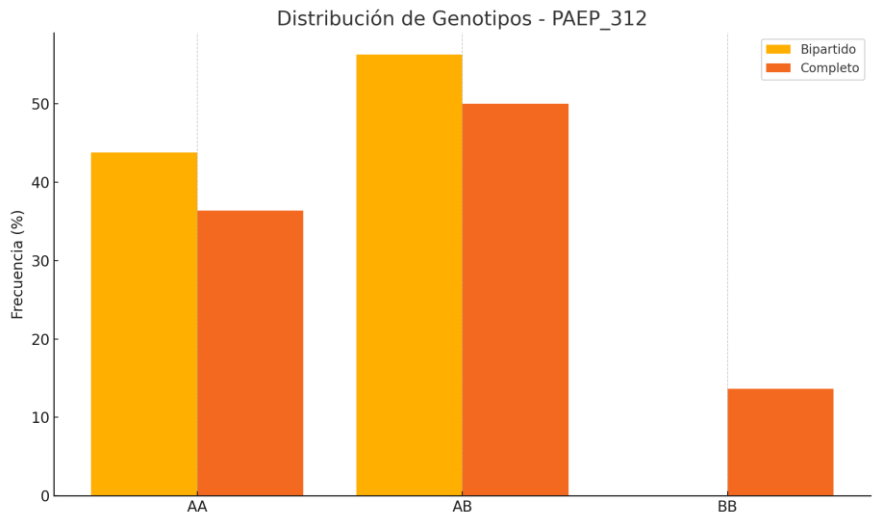


Figura 10 Distribución de genotipos para el SNP PAEP_312

Comparación de frecuencias genotípicas entre embriones bipartidos y completos en el SNP PAEP_312. Este gen influye en los sólidos totales de la leche. El genotipo BB aparece únicamente en embriones completos.

Fuente: Elaboración propia.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- La clonación embrionaria en bovinos de carne (*Bos taurus*) criados en ambiente tropical demuestra ser una estrategia viable para preservar características genómicas productivas claves, manteniendo la frecuencia de alelos favorables en genes como ABCG2, CSN2_245, CSN2_411 y GH1_2291. Sin embargo, la eficiencia genética de esta técnica puede verse modulada por la pérdida de variabilidad en loci específicos, lo que sugiere que su impacto no podría ser uniforme. Esto respalda la hipótesis de que la clonación puede modular mantener o alterar la eficiencia productiva, en función de la interacción entre genoma, epigenoma y ambiente uterino tropical.
- Respecto al objetivo específico 1 (variabilidad genética y expresión génica): Se observaron diferencias significativas en la frecuencia de genotipos entre embriones bipartidos y completos en genes como PAEP_225, PAEP_239, PAEP_312 y GHR_F279Y, lo que evidencia que la clonación puede inducir alteraciones en la distribución alélica, posiblemente como resultado de reprogramaciones epigenéticas incompletas. Esto concuerda con hallazgos de la literatura donde la clonación puede afectar la expresión génica, generando heterogeneidad funcional incluso entre individuos genéticamente idénticos, especialmente en ambientes tropicales con desafíos térmicos y metabólicos.
- Respecto al objetivo específico 2 (eficiencia y parámetros productivos): Los perfiles genotípicos observados en embriones bipartidos muestran una menor diversidad en loci claves relacionados con calidad de leche y funcionalidad proteica, como CSN3_470 y PAEP_225, en comparación con los embriones completos. Esta menor variabilidad genética podría traducirse en una reducción potencial de adaptabilidad productiva bajo condiciones tropicales, lo que implica que el uso de embriones clonados debe acompañarse de estrategias complementarias de selección y adaptación para maximizar su rendimiento zootécnico.

RECOMENDACIONES

- Aplicar la clonación embrionaria de forma selectiva, priorizando donantes con genotipos validados y deseables en loci funcionales clave (como *CSN3*, *PAEP* y *GHR*), para asegurar la expresión de características productivas bajo condiciones tropicales.
- Complementar los protocolos de clonación con análisis genómicos previos y posteriores, incluyendo la evaluación de SNPs estratégicos y perfiles epigenéticos, a fin de monitorear la estabilidad genética y predecir el rendimiento de los embriones generados.
- Evitar la pérdida de variabilidad genética, utilizando esquemas de reproducción asistida combinados con estrategias de conservación genética, como bancos de germoplasma y rotación de líneas donantes, lo cual permitirá mantener la adaptabilidad del hato en ambientes de alta exigencia climática.
- Fomentar la investigación sobre los mecanismos epigenéticos post-clonación, especialmente en condiciones tropicales, donde factores como el estrés térmico y la nutrición materna podrían alterar la expresión génica, afectando el desarrollo embrionario y la viabilidad del producto final.
- Incorporar estos hallazgos en los programas de mejora genética nacional, con énfasis en razas de carne adaptadas al trópico, promoviendo el uso de biotecnologías reproductivas avanzadas con respaldo científico y técnico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Viana JHM, Figueiredo ACS, Gonçalves RLR, Siqueira LGB. A historical perspective of embryo-related technologies in South America. Anim Reprod. 2018 Aug 3;15(Suppl 1):963-970. doi: 10.21451/1984-3143-AR2018-0016. PMID: 36249847; PMCID: PMC9536060.
2. Peter J. Hansen. Review: Some challenges and unrealized opportunities toward widespread use of the in vitro-produced embryo in cattle production animal. El Seiv. 2023 17;1(Suppl 1): 145-169 https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100745.
3. Wu B, Zan L. Enhance beef cattle improvement by embryo biotechnologies. Reprod Domest Anim. 2022 Oct;47(5):865-71. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01945.x. Epub 2011 Dec 1. PMID: 22128751
4. Arias, J, Araya M. Perspectivas de la agricultura y del Desarrollo rural en las Americas. CEPAL FAO; 2021. https://repositorio.cepal.org/server/api/core/bitstreams/ec3e9a9f-593e-4c55-85a3-b5eefbeca839/content
5. Shakweer WME, Krivoruchko AY, Dessouki SM, Khattab AA. A review of transgenic animal techniques and their applications. J Genet Eng Biotechnol. 2023 May 9;21(1):55. doi: 10.1186/s43141-023-00502-z. PMID: 37160523; PMCID: PMC10169938.
6. C Galli, R Duchi, G Crotti, P Turini, N Ponderato, S Colleoni, I Lagutina, G Lazzari. Bovine embryo technologies. The riog. 2023 Nov;59(2): 599-616. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01243-8.
7. D.C Faber, J.A Molina, C.L Ohlrichs, D.F Vander Zwaag, L.B Ferré, Commercialization of animal biotechnology. The riog. 2023 Sep;59(1): 125-138. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01264-5.
8. S. G. Moore, J. F. Hasler. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. J. Dairy Sci. 2017 May;21(1): https://doi.org/10.3168/jds.2017-13138
9. D.N. Wells. Animal cloning: problems and prospects. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 2005 Oct; 24 (1), 251-264.

https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=e9b54e22da2f677aeb9a1148744256b46da9e88a

10. Bagle TR, Kunkulol RR, Baig MS, More SY. Transgenic animals and their application in medicine. Int J Med Res Health Sci. 2012;2(1):107–116. https://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijmrhs&volume=2&issue=1&article=018&type=pdf
11. Einsiedel EF. Public perceptions of transgenic animals. Rev Sci Tech (Office International Des epizootics) 2005;24(1):149–157. doi: 10.20506/rst.24.1.1562.
12. Melo EO, Canavessi AMO, Franco MM, Rumpf R. Animal transgenesis: state of the art and applications. J Appl Genet. 2007;48(1):47–61. doi: 10.1007/BF03194657
13. Molina, R., Sánchez, H., Uribe, J. & Atzori, A. (2018). Efecto de la edad al primer parto y los días abiertos en un bovino doble propósito sobre la huella hídrica y de carbono. Revista de Investigación Agraria y Ambiental, 7 (2), 107-119. Recuperado de: http://hemeroteca. unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/1561/1908
14. Montenegro, S. & Hernández, Y. (2015). Biotecnología aplicada al desarrollo agropecuario colombiano. Re vista de Investigación Agraria y Ambiental, 6 (2) 97 108. Recuperado de: http://hemeroteca.unad.edu.co/ index.php/riaa/article/view/1408/1732
15. Morales JT, Cavestany D. Anestro posparto en vacas lecheras: tratamientos hormonales. Revisión. Veterinaria (Montev.) [Internet]. 1 de diciembre de 2012;48(188):19-27. Disponible en: https://revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/212
16. Rosete J V, Álvarez H, Urbán D, Fragoso A. Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino: cinco décadas de investigación en México. Rev. mex. de cienc. pecuarias [revista en la Internet]. 2021; 12(Suppl 3): 39-78. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242021000500004&lng=es. Epub 24-Ene-2022. https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5918.

17. Vásquez Borja S del carmen. Evaluación del método de transferencia embrionaria en novillas y vacas repectoras en una hacienda de producción bovina [Internet]. 2018. Disponible en: http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/13269/1/DE00015_TRABAJODETIT ULACION.pdf
18. Morales Cevallos LA. Efecto del proestro prolongado sobre el folículo dominante, niveles de esteroides y la tasa de preñez en receptoras de embriones bovinos [Internet]. 2020. Disponible en: https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1307/1/TTMV09D.pdf
19. Marizancén M A. Genetic improvement in cattle through artificial insemination and artificial insemination at fixed time. Rev Inves Agr Agro. jul 2017;32(1):247–56.
20. López-Martínez JL, Ossa-Saraz GA, Santana-Rodríguez MO. Estimación de parámetros genéticos para caracteres de crecimiento en bovinos criollos Romosinuano. Rev Colombiana Cienc Anim. Recia. 2021; 13(2):e845. https://doi.org/10.24188/recia.v13.n2.2021.845
21. Villavicencio EJL, Franco JAG, Espinosa AP. Caracterización morfométrica y faneróptica del bovino criollo Chinampo de México. Arch Zootec [Internet]. 2009 [cited 2024 Feb 2];58(222):277–9. Available from: https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S000459220090002000 12&script=sci_arttext&tlng=en
22. Vargas Rodríguez CF. Comparación de ganancias de peso en bovinos Reyna-Jersey y Jersey, durante la etapa de desarrollo. Agron Mesoam [Internet]. 2007 May 29 [cited 2024 Feb 5];19(2):227. Available https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/5004
23. Ramos Coaguila OP. Parámetros reproductivos en vacas Holstein (Bos taurus) inseminadas con semen sexado de toros Gyr (Bos indicus) en la irrigación Majes – Arequipa. 2023; Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/19368/Ramos_co.pdf?seq uence=1&isAllowed=y
24. Ríos Á, Martínez G, Calderón R, Montaño M, Vega V. Logros, retos y perspectivas de la investigación en mejoramiento genético de bovinos

productores de carne en el INIFAP. Rev. mex. de cienc. pecuarias [revista en la Internet]. 2021;12(Suppl 3): 1-22. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242021000500002&lng=es. Epub 24-Ene-2022. https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5883.

25. Casa J. Análisis del índice de selección del programa de mejoramiento genético sostenible de bovinos de leche en la parroquia mulaló, en el periodo 2023. Tesis posgrado. Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; 2024. Disponible: https://repositorio.utc.edu.ec/items/3623a5dc-df96-4367-8397-9c7b0f4ecfce
26. Caizapanta A, Yanza K. Estimación del índice del mérito genético total del programa de mejoramiento genético sostenible de bovinos de leche del cantón Latacunga, parroquia Ignacio Flores. Tesis pregrado. Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; 2023. https://repositorio.utc.edu.ec/server/api/core/bitstreams/2e8e72e9-4a50-4185-9035-7bfcda114745/content
27. Londoño M. Evaluación genética, evaluación genómica y búsqueda de regiones del genoma en ganado blanco orejinegro asociadas a características productivas. Tesis pregado. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias; 2020. Disponible en: https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/78201
28. Blott, S., Kim, J. J., Moisio, S., Schmidt-Küntzel, A., Cornet, A., Berzi, P., ... & Georges, M. (2003). Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genetics*, 163(1), 253–266. https://doi.org/10.1093/genetics/163.1.253
29. Boichard, D., Grohs, C., Bourgeois, F., Cerqueira, F., Faugeras, R., Neau, A., ... & Amigues, Y. (2003). Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. *Genetics Selection Evolution*, 35(1), 77–101. https://doi.org/10.1051/gse:2002037

30. Bovenhuis, H., van Arendonk, J. A. M., & Korver, S. (2015). Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. *Journal of Dairy Science*, 78(5), 1039–1049. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76720-2
31. Pañi, F., Jerves, C. (2023). Sistema de Monitoreo Ambiental Morona Santiago 2020. Fernando Cobeña DESIG STUDIO. 3(103). https://moronasantiago.gob.ec/wp-content/uploads/2021/05/Revista-Monitoreo-Ambiental-2020.pdf
32. Caroli, A. M., Chessa, S., & Erhardt, G. J. (2009). Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5335–5352. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2461
33. Cohen-Zinder, M., Seroussi, E., Larkin, D. M., Loor, J. J., Everts-van der Wind, A., Lee, J. H., ... & Ron, M. (2005). Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Research*, 15(7), 936–944. https://doi.org/10.1101/gr.3806705
34. Comin, A., Cassandro, M., Chessa, S., & Bittante, G. (2008). Effects of composite β- and κ-casein genotypes on milk quality and coagulation properties in Italian Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 91(10), 4020–4027. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0938
35. González-Recio, O., Ugarte, E., & Jiménez-Montero, J. A. (2008). The effect of polymorphisms in GHR and IGF1 genes on performance traits in dairy cattle. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6(3), 409–415. https://doi.org/10.5424/sjar/2008063-343
36. Heck, J. M. L., van Valenberg, H. J. F., Dijkstra, J., & van Hooijdonk, A. C. M. (2009). Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4745–4755. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2146
37. Ikonen, T., Ojala, M., & Ruottinen, O. (1999). Associations between milk protein polymorphisms and first lactation milk production traits in Finnish

Ayrshire cows. *Journal of Dairy Science*, 82(5), 1026–1033. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75323-3

38. Jinsmaa, Y., & Yoshikawa, M. (1999). Enzymatic release of neocasomorphin and β-casomorphin from bovine β-casein. *Peptides*, 20(8), 957–962. https://doi.org/10.1016/S0196-9781(99)00086-3
39. Kamiński, S., Cieślińska, A., & Kostyra, E. (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of Applied Genetics*, 48(3), 189–198. https://doi.org/10.1007/BF03195213
40. Kuss, A. W., Gogol, J., Bartenschlager, H., Geldermann, H., & Erhardt, G. (2005). Polymorphisms in the bovine β-lactoglobulin gene promoter and their association with milk production traits. *Journal of Dairy Science*, 88(6), 1994–2002. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72875-1
41. Lucy, M. C., Hauser, S. D., Eppard, P. J., Krivi, G. G., Clark, J. H., Bauman, D. E., & Collier, R. J. (2001). Variants of somatotropin and their association with milk yield and composition in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 84(2), 435–442. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74491-0
42. Ng-Kwai-Hang, K. F. (2017). Genetic polymorphism of milk proteins and their association with dairy production traits. *Animal*, 11(1), 117–132. https://doi.org/10.1017/S1751731116001869

43.Viitala, S., Szyda, J., Blott, S., Schulman, N., Lidauer, M., Mäki-Tanila, A., & Georges, M. (2006). The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor genes in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire dairy cattle. *Genetics*, 173(4), 2151–2164. https://doi.org/10.1534/genetics.105.054056

44.Zhang, H., Wang, Z., Wang, H., Zhang, Y., Wang, N., & Zhao, Y. (2011). Polymorphisms in the bovine GH gene and their associations with growth and carcass traits in Chinese cattle breeds. *Molecular Biology Reports*, 38(3), 1913–1919. https://doi.org/10.1007/s11033-010-0302-6