



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

**“ACELERACIÓN EN LA OBTENCIÓN DEL GENOTIPO A2A2 DEL GEN DE LA
BETA CASEÍNA DE LA LECHE MEDIANTE SUPEROVULACIÓN Y
TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN LA HACIENDA LA ESPERANZA”**

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

Autor:

Salguero Zamora Luis Miguel

Tutor:

Molina Cuasapaz Edie Gabriel

LATACUNGA – ECUADOR

Febrero 2023

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Luis Miguel Salguero Zamora, con cédula de ciudadanía No. 1804415055, declaro ser autor del presente proyecto de investigación: “Aceleración en la obtención del genotipo a2a2 del gen de la beta caseína de la leche mediante superovulación y transferencia de embriones en la HACIENDA LA ESPERANZA”, siendo el MVZ. Mg. Molina Cuasapaz Edie Gabriel, Tutor del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

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

Latacunga, 16 de febrero del 2023

Luis Miguel Salguero Zamora
Estudiante
C.C. 1804415055

MVZ. Molina Cuasapaz Edie Gabriel Mg.
Docente Tutor
C.C. 1722547278

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **SALGUERO ZAMORA LUIS MIGUEL**, identificado con cédula de ciudadanía **1804415055** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, el Doctor Cristian Tinajero, en calidad de Rector, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - **EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “Aceleración en la obtención del genotipo A2A2 del gen de la beta caseína de la leche mediante superovulación y transferencia de embriones en la HACIENDA LA ESPERANZA”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Abril 2018 - Agosto 2018

Finalización de la carrera: Octubre 2022 – Marzo 2023

Aprobación en Consejo Directivo: 30 de Noviembre del 2022

Tutor: MVZ. Mg. Molina Cuasapaz Edie Gabriel

Tema: “Aceleración en la obtención del genotipo A2A2 del gen de la beta caseína de la leche mediante superovulación y transferencia de embriones en la HACIENDA LA ESPERANZA”,

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

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

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

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

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

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

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

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

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

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

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

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 16 días del mes de febrero del 2023.

Luis Miguel Salguero Zamora

EL CEDENTE

Dr. Cristian Tinajero

LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“ACELERACIÓN EN LA OBTENCIÓN DEL GENOTIPO A2A2 DEL GEN DE LA BETA CASEÍNA DE LA LECHE MEDIANTE SUPEROVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN LA HACIENDA LA ESPERANZA”, de Salguero Zamora Luis Miguel, de la carrera de Medicina Veterinaria, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 16 de febrero del 2023

MVZ. Molina Cuasapaz Edie Gabriel, Mg.

DOCENTE TUTOR

CC: 1722547278

AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, el postulante: Salguero Zamora Luis Miguel, con el título del Proyecto de Investigación: “ACELERACIÓN EN LA OBTENCIÓN DEL GENOTIPO A2A2 DEL GEN DE LA BETA CASEÍNA DE LA LECHE MEDIANTE SUPEROVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN LA HACIENDA LA ESPERANZA”, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

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

Latacunga, 16 de febrero del 2023

Lector 1 (Presidente)

Dr. Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso, Ph.D.

CC: 0502236623

Lector 2

MVZ. Cristian Fernando Beltrán Romero, Mg.

CC: 0501942940

Lector 3

Dr. Rafael Alfonso Garzón Jarrin, Ph.D.

CC: 0501097224

AGRADECIMIENTO

Este trabajo de investigación y el resultado de mi formación, se la debo a mis abuelitos, padres, hermanos e instituciones, que no me alcanzaría esta página para detallar sus nombres, cualidades y virtudes, en mi memoria siempre estará el beneficio que recibí de ustedes, más bien le doy gracias a Dios por mi vida y por la suya, por haberlos puesto en mi camino para ayudarme a construir mis éxitos, sin duda son una bendición; y, por todas las cosas buenas que me permitieron sonreír y las malas que indudablemente me ayudaron a crecer.

Luis Miguel Salguero Zamora

DEDICATORIA

Dedico primero a Dios, a mis padres, hermanos, sobrina y novia ya que con el apoyo de cada uno ellos he podido terminar esta hermosa carrera que ha sido difícil, pero al final lo he logrado, a mis hermosos ángeles papi Juan y mami Sarita los cuales estoy seguro estarán contentos en el cielo.

Maestros, Amigos y trabajadores; que en el andar por la vida nos hemos ido encontrando; por que han motivado mi sueño y esperanzas, gracias a todos los que han recorrido conmigo este larguísimo camino que llega a su fin.

Luis Miguel Salguero Zamora

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “ACELERACIÓN EN LA OBTENCIÓN DEL GENOTIPO A2A2 DEL GEN DE LA BETA CASEÍNA DE LA LECHE MEDIANTE SUPEROVULACIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN LA HACIENDA LA ESPERANZA”.

AUTOR: Salguero Zamora Luis Miguel

RESUMEN

En el Ecuador, el precio que se paga por litro de leche de vaca a los pequeños y medianos productores es muy bajo, no existiendo concordancia con los costos elevados para producir un litro de leche. En humanos el bajo consumo de leche bovina se ha relacionado con problemas gástricos y autoinmunes asociados al consumo de leche en algunas personas. La mayoría de los supuestos riesgos de la β -caseína A1 provienen de un subproducto de su digestión “la beta-casomorfina-7 (BCM7)”. Hoy en día consumir una leche con la β -caseína A2A2, podría ser una alternativa importante para aquellos individuos con alergias e intolerancia a la lactosa y a la leche A1. Para el experimento se seleccionaron y genotiparon 4 vacas de la raza jersey; 3 vacas presentaron el genotipo de la β -caseína A1A2 y 1 vaca con el genotipo A1A1. Se uso material genético de macho (toro Tipper de STgenetics con el gen de la de la β -caseína A2A2 homocigoto). Mediante el uso de herramientas biotecnológicas se aplicó el protocolo de superovulación convencional en las vacas portadoras del genotipo A2A2, y se realizó la inseminación correspondiente a cada donadora. La colecta de los embriones se realizó, el día 15 del protocolo de superovulación mediante colecta del circuito cerrado con flujo discontinuo; se recuperaron los embriones y se valoró morfológicamente, su estadio de desarrollo y su calidad. Se obtuvieron 6 embriones viables de los cuales, se le realizo una biopsia y se trabajó con células del trofoblasto para la prueba qPCR de la β -caseína, obteniendo el 33% (2) de embriones son portadores del gen de la de la β -caseína A2A2 y el 66% (4) de embriones portadores del gen A1A2. Por tanto, se sugiere que es posible la multiplicación acelerada del Gen A2A2. Demostrando así, que se puede reducir el intervalo generacional para obtener animales productores de leche con β -caseína A2A2, mediante la aplicación de superovulación de vacas genotipadas y obtención de embriones A2A2 para ser transferidos a receptoras.

PALABRAS CLAVES: A2A2, bovinos, genes, leche, transferencia de embriones.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

TITLE: "ACCELERATION IN OBTAINING THE A2A2 GENOTYPE FROM THE BETA CASEIN FROM THE MILK THROUGH SUPEROVULATION AND EMBRYO TRANSFERENCE AT LA ESPERANZA RANCH"

AUTHOR: Salguero Zamora Luis Miguel

ABSTRACT

In Ecuador, the price paid for a milk liter to the major part of the small and medium producers of cow milk is too low, there is no concordance with the elevated cost of producing a liter of milk. In humans the low ingest of bovine milk has been related to gastric and autoimmune problems associated to the consume of milk in some people. The major part of the supposed β -casein risks come from a sub product of its digestion "beta-casomorphin-7(BCM7)". Nowadays the ingest of milk with A2A2 β -casein, can be an alternative for those individuals with allergies and milk A1 and lactose intolerance. For the experiment They were selected and genotyped 4 Jersey cows; three of them presented the genotype with the A1A2 beta casein, and one with A1A. It was used genetic material from a male (A Tipper bull from STgenetics with the gen of the A2A2 beta casein homozygous). Through the use of biotechnological tools, the superovulation protocol was applied in the cows which carried the A2A2 genotype, and it was performed the correspondent insemination to the donator. The embryo collect is performed on the day 15 of the superovulation protocol, through the methodology of the close circuit with discontinued flood; the embryos were recovered and morphologically valued, as well as their development stage and their quality. As the result, they were obtained six viable embryo, it was done a biopsy and it was worked with trophoblast cells for the qPCR test from the β -casein, obtaining as a result the 33% (2) embryos are carriers of the A2A2 beta casein gen and the 66% (4) embryos are carriers of the A1A2 gen. Therefore, it is suggested that is possible the accelerated multiplication of the A2A2 Gen. Proving that the time for obtaining milk producers animals with the A2A2 beta casein can be shortened through the application of superovulation of the genotyped cows and A2A2 embryo obtention to be transferred to receptors.

Keywords: A2A2, bovines, genes, milk, embryo transfer.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|------|
| DECLARACIÓN DE AUTORÍA | ii |
| CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR..... | iii |
| AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN..... | vi |
| AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN..... | vii |
| AGRADECIMIENTO | viii |
| DEDICATORIA..... | ix |
| RESUMEN | x |
| ABSTRACT | xi |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | xiv |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS | xv |
| | |
| 1. INFORMACIÓN GENERAL..... | 1 |
| 2. JUSTIFICACIÓN..... | 2 |
| 3. BENEFICIARIOS | 3 |
| 3.1 Directos: | 3 |
| 3.2 Indirectos:..... | 3 |
| 4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN..... | 4 |
| 5. OBJETIVOS..... | 5 |
| 5.1 Objetivo general: | 5 |
| 5.2 Objetivos específicos..... | 5 |
| 6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS..... | 6 |
| 7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA | 6 |
| 7.1 Actualidad de bovinos en Ecuador..... | 7 |
| 7.2 Producción de leche de bovinos en Ecuador..... | 7 |
| 7.3 Composición de la leche de bovino..... | 7 |
| 7.4 Proteína de la leche de bovino..... | 8 |
| 7.5 Factores que afectan en la composición de la leche..... | 9 |
| 7.6 Reproducción en bovinos | 9 |

| | | |
|------|--|----|
| 7.7 | Biotechnologías reproductivas | 10 |
| 7.8 | Criopreservación | 10 |
| 7.9 | Criopreservación de embriones..... | 10 |
| 7.10 | Técnicas aplicadas en reproducción de bovinos | 10 |
| 7.11 | Sincronización de celos en bovinos receptores | 11 |
| 7.12 | Superovulación en bovinos donantes | 11 |
| 7.13 | Fecundación in vitro..... | 11 |
| 7.14 | Inseminación artificial..... | 12 |
| 7.15 | Genotipado de animales | 12 |
| 7.16 | Transferencia de embriones | 12 |
| 7.17 | Por qué usar transferencia de embriones en bovinos de leche | 13 |
| 8. | VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS | 13 |
| 9. | METODOLOGÍA | 14 |
| 9.1 | Diseño experimental..... | 15 |
| 9.2 | Datos ubicación de la investigación | 14 |
| 9.3 | Situación Geográfica | 14 |
| 9.4 | Población de estudio..... | 14 |
| 9.5 | Tipo de estudio | 15 |
| 9.6 | Manejo del estudio | 15 |
| 9.7 | Genotipificación del gen de la β -caseína mediante qPCR | 15 |
| 9.8 | Aplicación de protocolo hormonal para superovulación en las vacas donadoras . | 16 |
| 9.9 | Colecta de embriones | 18 |
| 9.10 | Procedimiento de genotipificación del embrión..... | 19 |
| 10. | ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 19 |
| 10.1 | Análisis de las vacas donadoras del genotipo de la β -caseína A2A2..... | 19 |
| 10.2 | Evaluación del protocolo de superovulación tradicional en las vacas que tengan el genotipo A2A2 del gen de la β -caseína de la leche. | 21 |

| | | |
|------|---|----|
| 10.3 | Porcentaje de embriones con la genotipificación de la β -caseína A2A2. | 23 |
| 10.4 | Costo del tratamiento por vaca y por embriones producidos | 24 |
| 11. | IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS) | 25 |
| 11.1 | Impacto social | 25 |
| 11.2 | Impacto ambiental | 25 |
| 11.3 | Impacto económico | 25 |
| 12. | PRESUPUESTO DEL PROYECTO..... | 26 |
| 13. | CONCLUSIONES..... | 28 |
| 14. | RECOMENDACIONES | 28 |
| 15. | BIBLIOGRAFÍA..... | 29 |
| 16. | ANEXOS..... | 38 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabla 1 | Actividades y sistemas de tareas en relación a los objetivos planteados. | 6 |
| Tabla 2. | Composición de la leche..... | 7 |
| Tabla 3. | Protocolo de superovulación | 17 |
| Tabla 4. | Animales seleccionados para la genotipificación del gen de la β -caseína. | 19 |
| Tabla 5. | Animales donantes portadores del gen A2A2 en el protocolo de superovulación | 20 |
| Tabla 6. | Número de folículos obtenidos en las donantes A2A2 sometidas a protocolo de superovulación. Ver (Anexo 6). | 21 |
| Tabla 7. | Número de embriones obtenidos por vaca donadora A2A2 sometidas a protocolo de superovulación..... | 22 |
| Tabla 8. | Identificación del gen de la β -caseína en los embriones viables obtenidos mediante superovulación..... | 23 |
| Tabla 9. | Porcentaje de embriones con la genotipificación de la β -caseína A2A2 y A1A2..... | 24 |
| Tabla 10. | Costo de tratamiento por vaca super ovulada y por embriones producidos. | 24 |
| Tabla 11. | Costo de hormonas y materiales para el protocolo de superovulación. | 26 |
| Tabla 12. | Costo de materiales de oficina..... | 27 |
| Tabla 13. | Costo de las pruebas de laboratorio realizadas para la genotipificación de la β -Caseína de la leche. | 27 |

| | |
|--|----|
| Tabla 14. Costo total de la investigación..... | 27 |
| Tabla 15. Recursos humanos..... | 27 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1. Ubicación de la Hacienda la Esperanza | 14 |
|--|----|

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

Aceleración en la obtención del genotipo A2A2 del gen de la beta caseína de la leche mediante superovulación y transferencia de embriones en la HACIENDA LA ESPERANZA.

Fecha de inicio: octubre 2022

Fecha de finalización: marzo 2023

Lugar de ejecución: Salache - Cotopaxi

Unidad Académica que auspicia

Carrera que auspicia: Medicina Veterinaria

Proyecto de investigación vinculado:

Implementación del programa de mejoramiento genético sostenible de bovinos de leche en la provincia de Cotopaxi.

Equipo de Trabajo:

- Tutor/a: Gabriel Molina.
- Estudiante: Miguel Salguero

Área de Conocimiento:

3109.02 Ciencias Agrarias, Ciencias Veterinarias, Genética

Línea de investigación:

Análisis, Conservación y Aprovechamiento de la Biodiversidad Local.

Sub líneas de investigación de la Carrera:

Biodiversidad, mejora y conservación de recursos zoogenéticos.

2. JUSTIFICACIÓN

La industria alimentaria en la actualidad busca mejorar la composición y calidad de los productos obtenidos de la leche de vaca, puesto que es lo que demanda el consumidor (1), La leche de bovinos contiene 3 tipos de caseína: alfa, beta y kappa. La beta puede ser A1, A2, B, C y A3. La A1 y A2 son variantes genéticas de la proteína beta caseína de la leche que varían por un aminoácido (2).

Hace miles de años apareció una mutación en la raza *Bos taurus* que cambió la proteína presente en la leche de vaca, que en su origen contenía la β -caseína A2, que en la actualidad se la considera como poco alergénica en comparación con la variante de la beta caseína A1, que es la que ocasiona problemas gastrointestinales en personas diagnosticadas como intolerantes a la lactosa (3).

Desde el año 2002 se está trabajando en realizar estudios para determinar las ventajas con la leche con β -caseína A2, ya que, se considera poco alergénica en comparación con la variante A1 (4) por lo tanto se puede entender que la leche A2 tiene efecto positivo en la salud y evita el riesgo de muchas enfermedades.

En diferentes países ya se está seleccionando vacas que producen leche con la variante con β -caseína A2A2 y en el Ecuador no debe ser la excepción de la implementación de un programa de mejoramiento genético enfocado en la producción de leche con esta particularidad (5).

El precio del litro de leche que se paga al productor podría incrementar en el Ecuador, si la población incrementa el consumo de leche. Pero en el país el 70,3 % se considera que presentan intolerancia a la lactosa (6) pero si se considera la importancia de la β -caseína A2A2 que es más digestible (7), se puede alcanzar mejor precio para el productor.

Actualmente, la industria láctea en países como Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos venden más del 10% de esta leche y pagan al productor por el litro de leche con β -caseína A2A2, aproximadamente el 12% extra del precio oficial establecido (8).

De ahí la necesidad de producir leche que contenga la β -caseína A2A2, mediante la selección de reproductores que tengan el tipo A2A2. Pero para que un hato se convierta a este genotipo necesita de siete generaciones antes de llegar al 99% de hembras (9). No obstante, al emplear la superovulación y transferencia de embriones de las vacas con el genotipo A2A2 (donadoras),

en vacas con el genotipo A1A1 o A1A2 (receptoras), es posible que la siguiente generación de individuos sean el 100% A2A2 (10).

3. BENEFICIARIOS

3.1 Directos:

- Investigador principal del proyecto, requisito previo a la obtención del título de médico veterinario

3.2 Indirectos:

- Propietario de hacienda.
- Ganaderos que representan en el país aproximadamente 280.709 personas.

4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En el Ecuador, el precio que se paga a la mayoría de los pequeños y medianos productores de leche de vaca es insostenible, una de las causas del bajo precio es que en el país se produce más de lo que se consume, el bajo consumo de leche y sus derivados (11) en la población ecuatoriana podría estar relacionado en parte por la falta de expresión de genes responsables de la digestión de la leche de vaca.

La indigestión de la leche se ha tratado ya desde el punto de absorción del carbohidrato de la leche, la intolerancia a la lactosa, a partir de añadir la enzima lactasa a la leche, no obstante, se ha demostrado que la indigestión también es ocasionada por una de las proteínas de la leche, la β -caseína, de la cual los tipos más frecuentes son A1A1, A1A2 y A2A2 (5).

La variante A1 se considera que está asociada con intolerancia a la leche y con algunos problemas gastrointestinales (12) el tipo más fácil de digerir y por tanto el tipo de leche que mayor cantidad de personas puede consumir y en mayores cantidades es el A2A2 (6).

La mayoría de los programas de mejora genética de vacas de leche en países desarrollados seleccionan animales con la β -caseína A2A2 (8).

La demanda de leche A2 es considerada como una oportunidad a mediano plazo por el aumento de la población, el disponer de bovinos A2 a mediano plazo puede significar estar preparados ante una posible demanda, asegurando la recogida y venta de la leche, que en la actualidad es un problema ya que no se realiza los pagos del producto (5).

En consecuencia, han conseguido que la mayoría de las vacas produzcan leche con β -caseína A2A2, sin embargo, esto ha conllevado alrededor de seis generaciones que va incluso de 8 a 15 años de trabajo (10,13).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Acelerar la obtención del genotipo A2A2 del gen de la beta caseína de la leche mediante superovulación y obtención de embriones en la HACIENDA LA ESPERANZA.

5.2 Objetivos específicos

- Identificar el genotipo de la β -caseína de la leche de los bovinos de la hacienda La Esperanza mediante qPCR.
- Realizar superovulación en base al uso de Folltropin-V en forma degradante en las vacas que tengan el genotipo A2A2 del gen de la β -caseína de la leche.
- Comprobar que los embriones, resultado de la investigación contengan el genotipo A2A2 del gen de la β -caseína.

6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS

Tabla 1 Actividades y sistemas de tareas en relación a los objetivos planteados.

| Objetivo 1 | Actividad | Resultado de la actividad | Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos) |
|-------------------|--|---|--|
| | Genotipificación del gen de la β -caseína mediante qPCR | Genotipos de animales seleccionados en base a registros de la Hacienda la Esperanza | Resultados de laboratorio (Anexo 5) |
| Objetivo 2 | Actividad | Resultado de la actividad | Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos) |
| | Aplicación de protocolo hormonal para super ovulación | Embriones recuperados | Fotografías del trabajo realizado en campo (Anexo 7 y 8) |
| Objetivo 3 | Actividad | Resultado de la actividad | Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos) |
| | Aplicación de técnicas de genotipificación en embriones recolectados | Obtención de líquido amniótico para su análisis en el Laboratorio | Resultados de Laboratorio (Anexo 6) |

Fuente: Investigación directa

Elaboración: Propia

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

7.1 Actualidad de bovinos en Ecuador

En el Ecuador el ganado vacuno lidera el sector pecuario con un total de 4,07 millones de cabezas a nivel nacional. De los cuales se encuentra distribuido; sierra con el 51,9%, la región costa con el 39,1% y la región de la Amazonía con el 8,9% (14).

7.2 Producción de leche de bovinos en Ecuador

La producción diaria de leche a nivel nacional fue de 5,70 millones de litros para el año 2021. La provincia de Pichincha produce el 17,99 % del total Nacional, La Sierra Ecuatoriana abarca la mayor cantidad de producción de leche a nivel nacional cerca del 79,5%, mientras que la Costa ocupa el 16,3% y el Oriente el 4,03%. Según el ESPAC 2022 (14).

7.3 Composición de la leche de bovino

La leche proporciona nutrientes esenciales y es una fuente importante de energía, proteínas de alta calidad y grasas (15). Además, puede contribuir considerablemente a la ingestión necesaria de nutrientes como el calcio, magnesio, selenio, riboflavina, vitamina B12 y el ácido pantoténico (16).

Tabla 2. Composición de la leche

| Composición | % |
|--------------------|----------|
| Grasa | 3-4 |
| Proteínas | 3-5 |
| Lactosa | 5 |
| Agua | 83 |

Fuente: FAO 2023

Elaboración: Propia

7.4 Proteína de la leche de bovino

La concentración de proteína en la leche es distinta en las diferentes especies domésticas, pero de forma general se encuentra entre el 3% - 4%, siendo en la especie bovina la media alrededor del 3,5% (17). Las proteínas de la leche se dividen en dos grandes grupos: las **séricas**, que constituyen un 20% de la proteína total, y **caseínas**, que constituyen un 80% del total. Hay tres tipos de caseínas (18):

- α -caseína. Tiene dos variedades, α S1 y α S2.
- β -caseína.
- κ -caseína.

Las proteínas séricas o del suero de la leche son(18):

- α -Lactoalbúmina (α -LA)
- β -lactoglobulina (β -LG)

La leche de vaca posee proteínas como las caseínas y lactoglobulinas, que están asociadas a características de producción, el 75% de leche en el mundo tiene variantes genéticas con características no deseadas ocasionando un bajo consumo de leche de vaca (19). La leche de vaca contiene las proteínas α S1-caseína, α S2-caseína y β -caseína, las cuales constituyen aproximadamente el 70% del contenido proteico (20).

La β -caseína de los bovinos tiene diferentes formas o variantes (hasta ahora se han descrito 13), siendo las más importantes A1 y A2. Estas dos variantes se diferencian en sólo un aminoácido (**histidina** por **prolina** en la posición 67) de entre 209 que posee la proteína, producto de un polimorfismo o variación en la secuencia del gen CSN2, el cual codifica para β -caseína (21).

Originalmente los bovinos y otros rumiantes tenían la variante A2, pero una mutación exclusiva en bovinos *Bos Taurus* generó la variante A1 que se ha expandido dentro de las ganaderías productoras de leche (21).

La variante A1, es más hidrolizable que A2, es degradada por enzimas intestinales (ej. elastasa) que rompen la β -caseína generando algunos péptidos, como la β -casomorfina 7, el cual tiene actividad opioide y por tanto posibles efectos sobre los sistemas gastrointestinal, inmune y cardiovascular (22).

La variante A2, tiene un aumento en el porcentaje de proteína incluyendo propiedades reductoras del colesterol y triglicéridos en la leche, La β -caseína A2 se ha originado desde hace más de 10.000 años y no se han identificado efectos negativos en la salud humana (20).

Sin embargo, hace más de 10.000 años, y antes de ser domesticadas, las vacas producían únicamente la proteína beta-caseína A2 y no la beta-caseína A1. Pero, hace unos 8.000 años se produjo una mutación natural de un solo gen en los Holstein, lo que resultó en la producción de la proteína β -caseína A1 en esta raza (23).

7.5 Factores que afectan en la composición de la leche

La composición de la leche es un factor que determina su valor nutricional y calidad industrial que afecta directamente en la rentabilidad y competitividad en la producción de leche (24). La leche con mayor concentración de sólidos, esencialmente proteína y grasa, aportan más nutrientes al consumidor y mejoran la capacidad de la leche para convertirla en productos lácteos (25).

- Nutrición: Tipo y contenido de fibra
- Alimentación: Cantidad y tipo de proteína en la dieta
- Estacionalidad y ambiente
- Estado de lactancia
- Genética

7.6 Reproducción en bovinos

La producción de embriones *in vitro* es una biotecnología reproductiva que tiene un gran potencial como herramienta de mejora genética, ya que permite un período intergeneracional más corto y aumenta la difusión del material genético en las granjas (26).

Además, los embriones bovinos se han utilizado como modelos para el estudio de procesos metabólicos, genéticos y de desarrollo en embriones de otras especies, incluida la especie humana (27).

Este potencial ha facilitado el uso generalizado y comercial de esta tecnología durante la última década. La producción de embriones *in vitro* incluye los pasos de recolección de óvulos, maduración y fertilización, así como el cultivo de embriones. Esta es una biotecnología utilizada alternativamente para acelerar la producción de animales genéticamente superiores y para prevenir la respiración folicular *in vivo* (28).

7.7 Biotecnologías reproductivas

El rápido crecimiento tecnológico y la globalización no son desarrolladas plenamente en los países en desarrollo, como en la mayoría de los países Latinoamericanos (29). En el desarrollo de la biotecnología dirigida a la protección y conservación de las especies animales y vegetales, las biotecnologías promueven el uso sostenible y la conservación de la diversidad natural. Esto va acompañado de beneficios económicos, especialmente a nivel pecuario, ya que buscan incrementar su productividad en respuesta a la creciente demanda de productos animales (carne y leche) (30).

7.8 Criopreservación

La criobiología es una rama de la biología cuyo principal objetivo es la conservación de células vivas a bajas temperaturas para detener los procesos de envejecimiento y degeneración celular (31).

7.9 Criopreservación de embriones.

Los embriones preimplantacionales constituyen una unidad biológica fascinante porque contienen la información genética completa para el desarrollo de un animal adulto y pueden conservar este conjunto de células indefinidamente mediante técnicas especiales de congelación y posterior almacenamiento. Estos métodos, que incluyen la criopreservación, tienen como objetivo mantener el embrión en estado flotante y detener todos los procesos biológicos (31).

7.10 Técnicas aplicadas en reproducción de bovinos

En el ganado lechero intensivo, el sistema más común está representado por las vacas, en las cuales la reproducción se realiza por IA con semen congelado después de la detección del estro natural o sincronizado (32). En este sistema, la selección intensa para la producción de leche se asocia con el aumento de problemas de fertilidad. La mayor parte de la fertilización se logra mediante la reproducción natural, que tiene un control muy bajo sobre la reproducción, y los tratamientos hormonales se utilizan en un número limitado de sistemas en los países desarrollados (27).

Las biotecnologías reproductivas (congelación y transferencia de embriones, recuperación de ovocitos y/o fertilización *in vitro* después de la maduración de los ovocitos) pueden usarse tanto en ganado lechero como en ganado de carne e incluirse en esquemas de selección (33).

7.11 Sincronización de celos en bovinos receptores

Los tratamientos hormonales para sincronización de celo permiten resultados más efectivos en un protocolo de inseminación artificial a término fijo (AITF). Tenemos nuestras propias ventajas: mejora la rentabilidad de la explotación y la organización de la reproducción del ganado, permite una detección del celo más controlada, rápida, óptima y uniforme, acelera la mejora genética de la explotación; y permite programar entregas en los momentos deseados (34). Los métodos más comunes para sincronizar el calor en el ganado son: el uso de prostaglandinas y el uso de un prostageno que imita un cuerpo artificial (35).

7.12 Superovulación en bovinos donantes

La técnica de superovulación (SOV) para la producción e implantación de embriones es una de las biotecnologías más utilizadas en los programas de mejora genética ganadera. Sin embargo, las tasas de formación de embriones permanecieron relativamente estables a lo largo del tiempo, en las razas lecheras de 6,2 embriones viables recolectados por donante (36).

La variabilidad en el tratamiento superovulación sigue siendo un problema importante en los programas comerciales de transferencia de embriones. Esto se debe a que la manipulación de la dinámica folicular para obtener varios folículos dominantes, se realiza tradicionalmente a través de la terapia hormonal que incluye derivados sintéticos de las hormonas: folículo estimulante, estrógenos y progestágenos (37).

7.13 Fecundación in vitro

La fertilización *in vitro* (FIV) se utiliza para lograr la mejora genética en el ganado lechero, embriones producidos *in vitro* y transferidos frescos permiten obtener tasas de preñez del 60% este, porcentaje se reduce al 43% cuando los embriones son vitrificados (38).

En condiciones de laboratorio, un espermatozoide se fusiona con el óvulo para formar un nuevo individuo, lo que se denomina fertilización *in vitro*. Los embriones resultantes se depositan en un medio líquido enriquecido con los nutrientes necesarios para el desarrollo embrionario (39). Los cigotos resultantes se cultivan hasta estadios post-compactación (mórula o blastocisto), momento en el que se transfieren a una vaca receptora o se criopreservan para su posterior transferencia (40).

7.14 Inseminación artificial

Las biotecnologías como la inseminación artificial IA está diseñada para adaptarse al sector ganadero, principalmente para la reproducción, usando el espermatozoides de toros de alta producción, valorados por generaciones tanto para la producción de leche como de carne, que con el tiempo se refleja en nuevos cruces y han aumentado la productividad (41).

La IA fue la primera biotecnología reproductiva usada para mejorar la producción a través del uso eficiente de toros de alto mérito genético. El uso generalizado de esta técnica y el logro de su completo potencial requirió de la criopreservación del semen por largos periodos de tiempo (40).

7.15 Genotipado de animales

El conocimiento genómico es la puerta de entrada para medir la variación interindividual a nivel del ADN (42). El desarrollo de plataformas tecnológicas de genotipado masivo en los últimos años, es cada vez más eficiente en términos de velocidad y costo; ha permitido que la selección de reproductores tome en cuenta la variación del ADN, creando nuevas expectativas para la mejora del carácter donde esto es más difícil (43). Obtener una reacción genética. Genotipificar una mutación o un marcador significa poder leer qué base (A, C, T o G) está presente en una posición determinada. Las dos herramientas de genotipado de marcadores más utilizadas son las matrices de marcadores (matrices SNP) y la secuenciación del genoma a gran escala (44).

7.16 Transferencia de embriones

La tecnología de transferencia de embriones (TE) nos permite seleccionar animales con alta producción y adaptación ambiental para mejorar la calidad genética y aumentar el número de crías en el rebaño. La transferencia de embriones tiene una tasa de preñez del casi el 60 %, dependiendo la estación del año, e incluso con la transferencia de embriones congelados (45). El trasplante de embriones se utiliza de forma rutinaria en muchos países del mundo. Así, en el año 2020 se produjeron comercialmente 1.5 millones de embriones de bovinos a nivel mundial, en Sudamérica se produjeron 31.559 embriones *in vivo* y 500.397 embriones *in vitro* (46). La principal razón para su uso es mejorar la calidad genética de los criaderos utilizando donantes de alto rendimiento (45).

7.17 Por qué usar transferencia de embriones en bovinos de leche

El trasplante de embriones de bovinos lecheros ha contribuido al rápido crecimiento de la capacidad reproductiva de los bovinos y al mejoramiento genético, es una alternativa para mantener la producción de leche (47).

El objetivo del trasplante de embriones es obtener un mayor número de descendientes de ancestros genéticamente mejores, por lo que la introducción de la TE contribuye a la consecución de este objetivo, además de reducir los problemas reproductivos y de salud, permite la conservación de embriones recolectados de hembras donantes, lo cual es una ventaja de la aplicación de biotecnologías, con métodos no quirúrgicos en diferentes momentos, cumpliendo así exigencias de los productores pecuarios y del factor climático (48).

8. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS

H1: La superovulación y la transferencia de embriones en bovinos de leche permite la aceleración en la obtención del genotipo A2A2 del gen de la beta caseína.

H0: La superovulación y la transferencia de embriones en bovinos de leche no permite la aceleración en la obtención del genotipo A2A2 del gen de la beta caseína.

9. METODOLOGÍA

9.1 Datos ubicación de la investigación

Ubicación

País: Ecuador

Provincia: Tungurahua

Cantón: Tisaleo

Caserío: Chilco la Esperanza



Gráfico 1. Ubicación de la Hacienda la Esperanza

9.2 Situación Geográfica

La hacienda la esperanza se ubica en el cantón Tisaleo, Norte, barrio Angahuana, Sur, barrio Chilco, Oeste, Volcán Carihuairazo, Este, barrio San Francisco. Con una altitud de 3450 m.s.n.m. este tipo de suelo es irregular.

9.3 Población de estudio

El trabajo de investigación está dirigido en bovinos con el genotipo A2A2 pertenecientes a la hacienda la Esperanza, de las cuales, mediante las pruebas de genotipificación, se escogieron dos vacas que presentan esta característica y se eligió pajuelas de un toro con el mismo tipo de característica.

9.4 Tipo de estudio

Para esta investigación, se empleó un estudio de tipo experimental, en cuál se asigna un factor de estudio que es la β -caseína A2A2 en bovinos de leche y se controla mediante la genotipificación del genotipo en los animales que son elegidos para la superovulación y la fecundación con espermatozoides de toros de las mismas características genéticas, con la finalidad de obtener la aceleración de embriones que tengan este tipo de característica.

9.5 Diseño experimental

Para comprobar que los embriones, resultado de la investigación contengan el genotipo A2A2 del gen de la beta caseína, se realizó un análisis de la estadística descriptiva de los 6 embriones obtenidos, mediante tablas comparativas y cálculos de porcentaje en software Microsoft Excel 2010.

9.6 Manejo del estudio

La investigación se desarrolló en la Hacienda la Esperanza del cantón Tisaleo de la provincia de Tungurahua, con un periodo de 2 meses: diciembre 2022, febrero 2023, el método implementado es la genotipificación del gen de la β -caseína mediante qPCR en 2 vacas y la utilización de pajuelas de toros con el mismo gen, luego se procede a la aplicación de reproducción asistida, superovulación y transferencia de embriones, mediante la superovulación logrando obtener embriones, de los cuales se extrae el líquido amniótico para realizar genotipificación del gen de la β -caseína mediante qPCR y determinar si son o no portadores del genotipo A2A2.

9.7 Genotipificación del gen de la β -caseína mediante qPCR

El método desarrollado fue a través de PCR cuantitativa, en tiempo real, esta prueba detecta y cuantifica la secuencia específica de los ácidos nucleicos, dependiendo el contenido de nucleótidos, la separación de la cadena va a cambiar con la temperatura, observando así diferentes curvas de disociación en cada una de las muestras, dependiendo del alelo presente (49). Los genotipos que se identificaron son las variantes genéticas de la proteína de la β -caseína, encontrando genotipos homocigotos (A1A1, A2A2) y heterocigoto (A1A2). Los datos se interpretaron mediante un software diseñado específicamente para dicha discriminación (50).

De cada uno de los bovinos del hato se recolectaron muestras de sangre, 3 ml, en tubos con EDTA (tapa lila). Para la extracción del ADN de los embriones, se recuperaron células de trofoblasto. Posterior a la colecta, las muestras se almacenaron en RNA later a una temperatura de 2 a 6° para el envío al laboratorio de biología molecular. En donde, las muestras fueron mezcladas y agitadas con un buffer adecuado, posteriormente, para la extracción de ADN, se utilizó un kit EVAGREEN DYE (biotium), siguiendo las instrucciones de manejo y lectura del fabricante (51). Para la amplificación de la β -caseína se utilizó cebadores específicos. Los perfiles térmicos óptimos son a 95 °C durante 10 min, 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos y extensión a 65 °C durante 60 segundos. El proceso de genotipificación se realizó en el laboratorio de diagnóstico molecular (VETNAAT), en la ciudad de Quito, los cebadores utilizados no se los puede exponer dado que es un protocolo comercial, la amplificación fue monitoreada conforme ocurre la reacción (52).

9.8 Aplicación de protocolo hormonal para superovulación en las vacas donadoras

Se realizó un control ginecológico a las vacas del hato y se seleccionaron como donadoras a aquellas cuyo genotipo para la β -caseína sea A2A2, o tenga un alelo A2, que no se encuentren gestantes, estén ciclando y no presenten ninguna patología que afecte a la reproducción. El protocolo a utilizar fue el siguiente:

Tabla 3. Protocolo de superovulación

| Días | Hora | Fármaco | Contenido | Dosis | |
|-------|--------|--------------|---------------------------|----------------|----------------|
| | | | | farmacológica | Dosis aplicada |
| | | | Progesterona | | |
| Día 0 | 7:10 | Sincrogest | CIDR | 1 unidad (1gr) | 1 unidad |
| | | Gestavec | Progesterona | 100 mg | 2 ml |
| | | Sincrodiol | Benzoato de estradiol | 2 mg | 2ml |
| Día 4 | 7:10 | Folltropin-V | FSH | 87,5 UI | 2,5ml |
| | 19:10 | Folltropin-V | FSH | 87,5 UI | 2,5ml |
| Día 5 | 7:10 | Folltropin-V | FSH | 78,5 UI | 2,24 ml |
| | 19:10 | Folltropin-V | FSH | 78,5 UI | 2,24 ml |
| Día 6 | 7:10 | Folltropin-V | FSH | 52,0 UI | 1,48 ml |
| | | | Cloprostenol | | |
| | | Sincrocio | sodico | 500 µg | 2 ml |
| | | 19:10 | Folltropin-V | FSH | 52,0 UI |
| Día 7 | 7:10 | | Cloprostenol | | |
| | | Sincrocio | sodico | 500 µg | 2 ml |
| | | Folltropin-V | FSH | 26,0 UI | 0,75 ml |
| | | Retiro CIDR | | | |
| Día 7 | 19:10 | Folltropin-V | FSH | 26,0 UI | 0,75 ml |
| | 11: 00 | | Presenta celo | | |
| Día 8 | 11: 00 | | Inseminación | 1 pajuela | |
| | 23: 00 | | acetato de | | |
| Día 8 | 23: 00 | Sincroforte | buserelina | 0.008 mg | 2,5 ml |
| | | | | | |
| Día 9 | 11: 00 | | Se repite la inseminación | | |

Fuente: Protocolo de superovulación convencional - Elaboración: Propia

9.9 Colecta de embriones

La colecta de los embriones se realizó, el día 15, mediante la metodología del circuito cerrado con flujo discontinuo. Se realizó el siguiente protocolo: ingreso de la vaca donadora a la manga, chequeo ginecológico para la evaluación de la cantidad de cuerpos lúteos de cada ovario mediante ecografía, antisepsia de la región perianal, se utilizó la sonda Foley de dos vías Bioniche 20 x 30cc. Como medio de lavado se usó complete flush el cual es un medio comercial que posee las particularidades para realizar la recuperación de los embriones.

9.10 Búsqueda de embriones

Se buscó los embriones empleando el siguiente protocolo: Reposar el colector mínimo 10 minutos a 37°C, después de pasar el medio de recolección por un filtro con poros de aproximadamente (75µm de diámetro), se utilizó una placa de búsqueda con fondo cuadrulado, se visualizó el lavado con un estereoscopio a 10-20X, utilizando microcapilares Unopette o micropipetas especiales para la manipulación, se revisó cada placa dos veces, se movió la placa para evitar que se peguen a los bordes. A medida que los embriones se localizaron, se depositan en placas nunc de 4 pozos, conteniendo medio de mantenimiento (Bioniche®) a 37°C, se lavan y se retiran los detritus, a medida que se pasan de un pozo a otro se clasifican de acuerdo con la nomenclatura recomendada (47,53).

- G I Mientras que, para valorar la recolección, no existen defectos visibles, los blastómeros son claramente visibles, de color y estructura uniformes, simétricos, de forma esferoide y la zona pelúcida está intacta;
- G II: Bueno, el embrión tiene muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de detritus celulares, su forma puede ser ligeramente irregular;
- G III: Regular, el embrión posee varios defectos: detritus celulares, forma irregular, de color muy oscuro o muy claro y/o ligero agrietamiento de la zona pelúcida;
- G IV: Malo, el embrión posee muchos defectos: los correspondientes al G III más desarrollo retardado, seria ruptura de la zona pelúcida –el embrión puede encontrarse parcialmente fuera de ella-, forma muy asimétrica, tendencia a la desintegración como granulación o vacuolización de los blastómeros (ver Anexo 6 gráfico 2). Incluye también a los estadios hasta 8 células y la clara degeneración, esta categoría es considerada como no transferible (53).

9.11 Procedimiento de genotipificación del embrión

Para la extracción del ADN de los embriones, se recuperaron células de trofoblasto. Los 6 embriones recuperados y analizados estuvieron en etapa de blastocisto. Se aislaron en pocillos individuales con PBS, posteriormente la biopsia se obtuvo por incisión del trofoblasto (trofoectodermo), la técnica no es invasiva para las células de la masa celular interna, se utilizó un microscopio Nikon verticales adaptado con una cuchilla de micromanipulación. Se extrajo las células del trofoectodermo con una micropipeta de 1 μ L de la muestra celular, y se agregó inmediatamente 10% de suero fetal, como medio de cultivo. De los 6 embriones posterior a la biopsia, 3 fueron valorados como muy buenos (biopsia entre 4 y 8 células), y 3 como buenos (biopsias entre 8 y 15 células) (54,55). Las muestras fueron transportadas en tubos eppendorf al laboratorio VETNATT, en donde se realizó las qPCR de cada embrión.

10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 4. Animales seleccionados para la genotipificación del gen de la β -caseína.

| Nombre | Sexo | Fecha/nacimiento | Raza | Genotipo de la β -caseína |
|---------|--------|------------------|--------|---------------------------------|
| Tamara | Hembra | 24/07/2019 | Jersey | A1A2 |
| Flor | Hembra | 20/01/2020 | Jersey | A1A2 |
| Jovita | Hembra | 18/02/2020 | Jersey | A1A2 |
| Marcela | Hembra | 01/11/2019 | Jersey | A1A1 |
| Tipper | Macho | 04/21/2016 | Jersey | A2A2 |

Fuente: VETNATT, Asociación Jersey Ecuador, STgenetics

Elaboración: Propia

10.1 Análisis de las vacas donadoras del genotipo de la β -caseína A2A2

Se realizó el análisis de las 4 vacas donadoras para identificar aquellas portadoras del genotipo A2A2 mediante la técnica de qPCR en asociación de datos genealógicos de registros de la Hacienda La Esperanza. Las vacas seleccionadas como donadoras fueron sometidas a las pruebas de genotipificación del gen β -caseína, de las cuales se obtuvo 3 con el genotipo de la β -caseína A1A2 y una vaca es A1A1 (Tabla 4) (Anexo 5), mientras que el toro fue elegido de la casa comercial STgenetics de origen americano con características del genotipo de la β -caseína A2A2.

Varias razas de ganado bovino presentan diferencias en los porcentajes constitutivos del gen de la β -caseína A1 y A2. Para Woodford 2007, es probable que la raza Jersey porte el alelo A1 en aproximadamente un 35% en el rebaño (56). Siendo en la raza jersey el alelo A2 el levemente predominante más que en otras razas de ganado bovino.

Se ha descrito en ganado bovino que el genotipo de la β -caseína predominante en grupos experimentales presenta una frecuencia para A1A2, A1A1 y A2A2 de 0.57, 0,51 y 0.50 respectivamente (57), en otro estudio se indica la frecuencia del genotipo A1A2 es de 0,73; los rangos de frecuencia aumentados indican una mayor presencia de este alelo, siendo útil para la selección de vacas portadoras del genotipo deseado para desarrollar programas de mejoramiento genético (58). Varios estudios recientes comparan resultados de años pasados en los cuales muestran una tendencia en el incremento de la frecuencia de alelo A2 en hatos lecheros (57).

Al elegir toros genéticamente portadores del gen A2A2 homocigótico como reproductores, se tiene la certeza de que transmitirá un alelo A2 a sus descendencias (59). Sin embargo, siendo el otro alelo transmitido por la madre las proporciones de cruzamientos se presentarán acorde a las leyes de Mendel (60). Por lo tanto, se sugiere que hay un incremento en la tendencia de la presencia del Alelo A2 de la β -caseína en granjas productoras de leche que incluyan reproductores portadores del gen A2.

Concluyendo, que al usar este tipo de reproductores con genotipo de la β -caseína deseada, es posible predecir el genotipo de los hijos. Esto hace que los productores de leche puedan obtener un rebaño homocigótico de A2 únicamente mediante selección genética.

Tabla 5. Animales donantes portadores del gen A2A2 en el protocolo de superovulación

| Nombre | Sexo | Fecha/nacimiento | Raza | Genotipo de la β-caseína |
|---------------|-------------|-------------------------|-------------|--|
| Flor | Hembra | 20/01/2020 | Jersey | A1A2 |
| Jovita | Hembra | 18/02/2020 | Jersey | A1A2 |
| Tipper | Macho | 04/21/2016 | Jersey | A2A2 |

Fuente: Investigación directa - Elaboración: Propia

Se eligieron a dos vacas donadoras para realizar el protocolo de superovulación, aquellas que presentaban las condiciones reproductivas adecuadas, siendo la vaca de nombre Tamara descartada del experimento por compromiso en su locomoción.

10.2 Evaluación del protocolo de superovulación convencional en las vacas que tengan el genotipo A2A2 del gen de la β -caseína de la leche.

Se realizó la superovulación de dos donantes A2A2 aplicando protocolo convencional mencionado en metodología, las vacas presentaron celo acorde al protocolo establecido y fueron inseminadas post celo con intervalo de 12 horas la primera inseminación y 24 horas la segunda inseminación post celo. Se emplearon 2 pajuelas por vaca con una concentración espermática de 15 millones por 0.5 ml. A los 8 días post inseminación se evaluó la respuesta a la superovulación, mediante ecografía obteniendo cuerpos lúteos con diámetros en un rango de 17.5 mm a 23.5 mm (Tabla 6) (Anexo 7,8).

Tabla 6. Número de folículos obtenidos en las donantes A2A2 sometidas a protocolo de superovulación. Ver (Anexo 6).

| Vaca | Ovario Derecho Folículos | Ovario Izquierdo Folículos |
|-------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Flor | 4 | 3 |
| Jovita | 5 | 6 |

Fuente: Investigación directa

Elaboración: Propia

10.3 Resultado de los embriones recuperados

De los embriones recuperados se obtuvieron 9 los cuales fueron 6 fueron viables y los otros 3 embriones no fueron viables, 3 embriones viables de la vaca de nombre Jovita y los 3 embriones de la vaca de nombre Flor fueron viables.

Tabla 7. Número de embriones obtenidos por vaca donadora A2A2 sometidas a protocolo de superovulación.

| Nombre | Sexo | Fecha/ Nacimiento | Raza | Embriones viables | Embriones no viables |
|--------|--------|----------------------|--------|----------------------|-------------------------|
| Flor | Hembra | 20/01/2020 | Jersey | 3 | 2 |
| Jovita | Hembra | 18/02/2020 | Jersey | 3 | 1 |

Fuente: Investigación directa

Elaboración: Propia

En el experimento por vaca donante se obtuvieron 3 embriones viables de acuerdo al grado de clasificación GI y GII de la Sociedad de Internacional de Tecnología Embrionaria - IETS 2010. Este resultado es inferior a lo reportado en condiciones del Zamorano en el que se indica que el número de embriones obtenidos fue de 8,5 embriones por vaca donante (61), y de 9,3 embriones viables por vaca obtenidos en la sierra ecuatoriana (62). Sin embargo, nuestros resultados fueron superiores a los obtenidos en el Carchi que fueron 2 embriones viables aplicando protocolos de superovulación similares a nuestro experimento (63).

El resultado obtenido en nuestro experimento respecto al número de embriones viables podría ser consecuencia del efecto de las condiciones climáticas adversas presentes durante el desarrollo del protocolo de superovulación, lo cual podría haber influido en la respuesta superovulatoria asociada al estrés generado en las donantes.

Luego de obtener los embriones (ver Anexo 6 gráfico 2) se procedió a la clasificación de los embriones de acuerdo a su conformación, estructura (GI, GII, GIII, GIV) a la toma de ADN del trofoblasto, para realizar la prueba de genotipificación de la beta caseína de los embriones obtenidos, obteniendo así los siguientes resultados (Tabla 8) (Anexo 6):

10.4 Genotipificación de los embriones del gen de la β -caseína

Luego de obtener los embriones (ver Anexo 6 gráfico 2) se procedió a la clasificación de los embriones de acuerdo a su morfología (IETS 2010), clasificando a los embriones según su grado (GI, GII, GIII, GIV) para la toma de las muestras de ADN del trofoblasto y realizar la prueba de genotipificación de la beta caseína de los embriones obtenidos seleccionados, obteniendo así los siguientes resultados (Tabla 8) (Anexo 6):

Los embriones recuperados fueron sometidos a las pruebas de genotipificación para la identificación del genotipo de la β -caseína A1A2 y A2A2.

Tabla 8. Identificación del gen de la β -caseína en los embriones viables obtenidos mediante superovulación.

| N° | Identificación muestra | Código | Tipo de muestra | Genotipo |
|----|------------------------|--------|-----------------|----------|
| 1 | Jovita x Tipper 1 | ET001 | TROFOBLASTO | A1A2 |
| 2 | Jovita x Tipper 2 | ET002 | TROFOBLASTO | A1A2 |
| 3 | Jovita x Tipper 3 | ET003 | TROFOBLASTO | A2A2 |
| 4 | Flor x Tipper 1 | ET004 | TROFOBLASTO | A1A2 |
| 5 | Flor x Tipper 2 | ET005 | TROFOBLASTO | A2A2 |
| 6 | Flor x Tipper 3 | ET006 | TROFOBLASTO | A1A2 |

Fuente: VETNATT Elaboración: Propia

La única forma de garantizar que se produzca una descendencia A2A2 en un programa de reproducción es cruzar una vaca A2A2 con un toro A2A2. Cuando se produce el cruce de una hembra A1A2 con un toro A2A2, existe un 50% de probabilidad de obtener una descendencia A1A2 y un 50% de probabilidad de obtener una descendencia A2A2 (64).

Es importante la genotipificación de los embriones bovinos, con los resultados obtenidos se puede inferir sobre las características o rasgos deseados a mejorar; por tanto, los embriones seleccionados se pueden transferir o no a una vaca receptora para que un sistema de producción lechero produzca leche A2A2.

10.5 Porcentaje de embriones con la genotipificación de la β -caseína A2A2.

Nuestro estudio demuestra que el porcentaje de obtención para el genotipo de la β -caseína A2A2 es inferior al de la obtención de la β -caseína A1A2, que es el mayor porcentaje de embriones que se obtuvieron al realizar este tipo de cruzamiento.

Tabla 9. Porcentaje de embriones con la genotipificación de la β -caseína A2A2 y A1A2.

| Identificación | Genotipo A2A2 | Genotipo A1A2 | % |
|-----------------------|----------------------|----------------------|------------|
| Vaca 1 | 33% | 66% | 100 |
| Vaca 2 | 33% | 66% | 100 |

Fuente: Investigación directa

Elaboración: Propia

Si se compara con herencia mendeliana se puede entender que el número de embriones al cual se realizó la genotipificación tiene un porcentaje menor al esperado del 50% en el genotipo A2A2 (66). Lo que significa que el número de embriones obtenidos no representan los resultados esperados del genotipo A2A2, si se incrementa el número de embriones obtenidos se llegara a la estimación esperada. Por lo tanto, la genotipificación de embriones bovinos es viable para conocer el genotipo con anticipación y mejora la precisión de selección a los animales en un hato.

10.6 Costo del tratamiento por vaca y por embriones producidos

El costo estimado por el protocolo de superovulación y recuperación de embriones, por vaca donante fue de 567,50\$ y por embrión viable recuperado fue de 189,16 con una inversión del experimento del 70% y del 30% de la empresa privada.

Tabla 10. Costo de tratamiento por vaca super ovulada y por embriones producidos.

| Nombre | Costo trt/vaca (\$) | Embriones viables | Costo e/vaca (\$) |
|---------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Jovita | 567,50 | 3 | 189,16 |
| Flor | 567,50 | 3 | 189,16 |
| Total | 1135 | 6 | |

Fuente: Investigación directa

Elaboración: propia

Del análisis de costos de producción de embriones bovinos se indica que el precio de la producción de un embrión es elevado para los pequeños y medianos productores respecto al cruzamiento natural que infiere un costo más bajo.

; sin embargo, es importante comprender que la superovulación y transferencia de embriones es una herramienta importante para la reducción del intervalo generacional y mejora genética acelerada. Por tanto, consideramos que es una inversión necesaria para los productores para estar acorde con las nuevas competencias del mercado.

Finalmente pese a que el uso de biotecnologías reproductivas es aún deficiente respecto a su masificación en el sector pecuario, la competencia del mercado hace que su aplicación se vuelva una oportunidad para mejorar la producción de leche y aumentar la calidad de la misma.

11. IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS)

11.1 Impacto social

Promover el mejoramiento genético en bovinos de leche que contengan el genotipo de la β -caseína A2A2, incentivando el consumo de este tipo de leche que posiblemente mejora la salud evitando problemas gastrointestinales respecto a las proteínas de la leche bovina.

11.2 Impacto ambiental

A futuro se prevé que la industria de la leche utilice animales portadores del gen de la β -caseína A2A2, volviendo a la ganadería más eficiente. Además, posibilita a este recurso genotípico (embriones con gen A2A2) se crío-preserve para un aprovechamiento futuro de estos animales.

11.3 Impacto económico

Obtener un valor agregado al precio de la leche de vaca con características de la β -caseína A2A2, promoviendo el consumo de leche como parte fundamental en la nutrición y que esta no ocasione problemas de salud; considerando que la β -caseína A2A2 es mejor digerida por personas intolerantes a la caseína y a la lactosa.

12. PRESUPUESTO DEL PROYECTO

Tabla 11. Costo de hormonas y materiales para el protocolo de superovulación.

| Materiales de campo | Cantidad | Costo |
|---------------------------------|-----------------|----------------|
| Folltropin | 2 | 740 |
| PBS medio de Lavado ABT 1 litro | 1 | 48 |
| Lidocaina | 1 | 4 |
| Xilacina | 1 | 6 |
| Papel secante | 1 | 6,5 |
| Paquete de guantes de manejo | 1 | 9,75 |
| Jeringillas de insulina | 15 | 2,25 |
| Jeringillas de 20 ml | 20 | 5 |
| Holding | 1 | 8,53 |
| Etilemglicol | 1 | 8,53 |
| Gel lubricante | 1 | 10,5 |
| Esponjas para lavar la vulva | 2 | 1 |
| Sincroforte 20ml | 1 | 19,2 |
| Sincrocio 20ml | 1 | 16,8 |
| Sincrodiol | 1 | 10,8 |
| Sincrogest (10x1) | 1 | 84 |
| Gestavec | 1 | 13,5 |
| Agujas de 18x 1 ½ | 1 | 3,5 |
| Guantes ginecologicos | 1 | 6,5 |
| Fortemil | 4 | 60 |
| Pajuelas | 4 | 36 |
| Sonda foley | 1 | 21 |
| Alcohol | 1 | 2,5 |
| Yodo 1 litro | 1 | 10 |
| Pajillas | 6 | 1,5 |
| | Total | 1135,36 |

Tabla 12. Costo de materiales de oficina

| Materiales de oficina | Cantidad | Costo |
|--|-----------------|---------------|
| Cuaderno | 1 | 0,8 |
| Esferos | 3 | 0,9 |
| Impresiones | | 50 |
| Computador, internet, actualizaciones | | 80 |
| Total | | 131,70 |

Tabla 13. Costo de las pruebas de laboratorio realizadas para la genotipificación de la β -Caseína de la leche.

| Pruebas de Laboratorio | Cantidad | Valor unit. | Costo |
|---|-----------------|--------------------|--------------|
| Genotipificación de la β -Caseína de la leche | 4 | 12 | 48 |
| Genotipificación de la β -Caseína de la leche embriones | 6 | 12 | 72 |
| | | Total | 120 |

Tabla 14. Costo total de la investigación

| Implemento | Costo \$ |
|---|-----------------|
| Hormonas, materiales e insumos veterinarios | 1135,36 |
| Pruebas de laboratorio | 120 |
| Materiales de oficina | 131,70 |
| Costo total investigación \$ | 1387,06 |

Tabla 15. Recursos humanos

| Recursos humanos | |
|-------------------------|-----------------|
| Estudiante: | Miguel Salguero |
| Docente: | Gabriel Molina |

13. CONCLUSIONES

- La genotipificación de vacas con beta caseína A2A2 es una herramienta que se puede usar para el mejoramiento genético enfocado en mejorar la calidad de la leche, aumentar el consumo y por consecuencia el ingreso económico de un valor agregado por animales que tienen esta característica en los alelos de la β -caseína.
- El uso de hormonas en protocolos de superovulación, es un problema que enfrentan los ganaderos por el costo que representan, además de que categoriza a los ganaderos en grandes, medianos y pequeños, para estos últimos no es accesible este gasto que en un mediano plazo puede considerarse como una herramienta que permite obtener animales de características genotípicas competitivas en las demandas de la globalización actual.
- La obtención de embriones transferibles con genotipo de la β -caseína A2A2, es una realidad visible en la actualidad por el uso de pruebas moleculares que ayudan a predecir animales con características genotípicas deseables logrando así decidir si se debe transferir o no a un animal receptor.

14. RECOMENDACIONES

- La selección de animales donadores se debe basar en los registros, con el pedigree de cada animal para poder obtener las características hereditarias de sus padres, así como la parte genotípica como los genes de la beta caseína A2A2, una característica a mejorar en ganaderías lecheras.
- Los animales considerados como donadores deben tener un mejor plan nutricional, dependiendo del piso climático, realizar un chequeo ginecológico del aparato reproductivo de la hembra, observar que se encuentre sano y funcional, especialmente sus ovarios, observar folículos y cuerpo lúteo que se encuentren dentro del ciclo estral normal.
- Para el lavado o colecta de embriones, las instalaciones de trabajo donde se manipulen animales y las áreas de materiales de experimentación deberán contar con una desinfección y higiene adecuada.

15. BIBLIOGRAFÍA

1. Requena FD. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504 2007 Volumen VIII Número 1 REDVET Rev. electrón. vet. 2007;
2. Contexto Ganadero. ¿Sabe usted de qué se trata la leche con beta-caseína A2? | CONtexto ganadero [Internet]. 2018 [citado 9 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/sabe-usted-de-que-se-trata-la-leche-con-beta-caseina-a2>
3. Brik D. Universidad en Ecuador desarrolla leche A2A2, opción ganadera más digerible - SWI swissinfo.ch [Internet]. 2021 [citado 9 de enero de 2023]. Disponible en: https://www.swissinfo.ch/spa/ecuador-leche_universidad-en-ecuador-desarrolla-leche-a2a2--opci%C3%B3n-ganadera-m%C3%A1s-digerible/47108788
4. Hernández S. Actualización de protocolos de transferencia de embriones a tiempo fijo. 2019;
5. Alfonso L, Urrutia O, Mendizabal JA. Conversion to A2 milk production with regard to a possible market demand for dairy farms: Possibilities and implications. ITEA Informacion Tecnica Economica Agraria. 1 de septiembre de 2019;115(3):231–51.
6. Paz-Y-Miño C, Burgos G, López-Cortés A, Herrera C, Gaviria A, Tejera E, et al. A study of the molecular variants associated with lactase persistence in different Ecuadorian ethnic groups. American Journal of Human Biology [Internet]. 1 de noviembre de 2016 [citado 13 de febrero de 2023];28(6):774–81. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ajhb.22865>
7. Soria Parra ME, Soria Parra CA, Méndez Álvarez S, Argudo Garzón D, Serpa García G, Torres Inga C, et al. Valoración de dos protocolos de superovulación para la producción de embriones en vacas Holstein. Revista de Producción Animal [Internet]. 2018 [citado 9 de enero de 2023];30(2):52–6. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202018000200008&lng=es&nrm=iso&tlng=en

8. García P, Quintela L, Becerra J, Peña A. La transferencia de embriones en bovinos | PortalVeterinaria [Internet]. 2018 [citado 9 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.portalveterinaria.com/rumiantes/articulos/14123/la-transferencia-de-embriones-en-bovinos.html>
9. LECHE GLORIA. Toda la verdad sobre la leche A2A2. EL PORONGUITO. 2019;2–3.
10. Alfonso L, Urrutia O, Mendizabal JA, Autor *. Conversión de las explotaciones de vacuno de leche a la producción de leche A2 ante una posible demanda del mercado: posibilidades e implicaciones. ITEA, información técnica económica agraria: revista de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA), ISSN 1699-6887, Vol 115, N° 3, 2019, págs 231-251 [Internet]. 2019 [citado 13 de febrero de 2023];115(3):231–51. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7207821&info=resumen&idoma=SPA>
11. Dirección nacional de estudios del mercado. Informe del sector lácteo en el Ecuador. Quito; 2016.
12. Asledottir T, Petrat-Melin B, Le T, Devold T, Larsen L, Vegarud G. Identification of bioactive peptides and quantification of β -casomorphin-7 from bovine β -casein A1, A2 and I after ex vivo gastrointestinal digestion. . International Dairy Journal . 2017;71:98–106.
13. Jimenez C. Superovulación: Estrategias, factores asociados. 2009;
14. INEC. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua. Quito; 2022.
15. Fernández EF, Hernández JAM, Suárez VM, Villares JMM, Yurrita LRC, Cabria MH, et al. Documento de Consenso: importancia nutricional y metabólica de la leche. Nutr Hosp [Internet]. 2015 [citado 13 de febrero de 2023];31(1):92–101. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112015000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
16. FAO. Producción y productos lácteos: Composición de la leche [Internet]. Portal lácteo. 2023 [citado 29 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.fao.org/dairy-production-products/products/composicion-de-la-leche/es/>

17. Colombia A, Gómez A, Bedoya Mejía O. Revista Lasallista de Investigación. Rev Lasallista Investig [Internet]. 2005 [citado 13 de febrero de 2023];2(1):38–42. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69520107>
18. Requena FD, Agüera EI, Requena F. Genética de la caseína de la leche en el bovino Frisón (Milk of casein of genetic in the Frison bovine). REDVET. 2007;8(1).
19. García Cochagne J. Identificación de proteínas lácteas asociadas a características de importancia en la industria lechera. Instituto Nacional de Innovación Agraria [Internet]. 2020 [citado 29 de enero de 2023];20–30. Disponible en: <https://pgc-snia.inia.gob.pe:8443/jspui/handle/20.500.12955/1714>
20. Padilla Doval J, Carlos Zambrano Arteaga J, de correspondencia A, Doval PJ, Arteaga Estructura ZJ. Estructura, propiedades y genética de las caseínas de la leche: una revisión. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia [Internet]. 31 de diciembre de 2021 [citado 29 de enero de 2023];16(3):62–95. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-96072021000300062&lng=en&nrm=iso&tlng=es
21. Carvajal AM, Levicoy D. Leche A2, potencial para la producción de una leche funcional en el sur de Chile. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS - INFORMATIVO INIA REMEHUE [Internet]. 8 de abril de 2022 [citado 29 de enero de 2023];2–5. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/359819863>
22. Jianqin S, Leiming X, Lu X, Yelland GW, Ni J, Clarke AJ. Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. Nutr J [Internet]. 2 de abril de 2016 [citado 29 de enero de 2023];15(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27039383/>
23. ÇAK B. Discussions of Effect A1 and A2 Milk Beta-Casein Gene on Health. Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences. 12 de marzo de 2018;3(2).
24. FAO. Producción y productos lácteos: Composición de la leche [Internet]. Portal Lácteo. 2023 [citado 13 de febrero de 2023]. Disponible en:

<https://www.fao.org/dairy-production-products/products/composicion-de-la-leche/es/>

25. García IC, Panadero AN. Factores que influyen en la composición nutricional de la leche. *Revista Ciencia Animal* [Internet]. 1 de octubre de 2012 [citado 2 de febrero de 2023];1(5). Disponible en: <https://ciencia.lasalle.edu.co/ca/vol1/iss5/7>
26. Quintana M, Herrera P, Ramos B, Agüero F. Biotecnología reproductiva aplicada a la mejora genética de *Bubalus bubalis* en Cuba. *SciELO* [Internet]. septiembre de 2018 [citado 13 de febrero de 2023];40(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2018000300009&lng=es&nrm=iso
27. Díez C, Muñoz M, Caamaño J, Gómez Enrique. Biotecnologías reproductivas: Producción y criopreservación de embriones *in vitro*. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario [Internet]. SERIDA. 2010 [citado 13 de febrero de 2023]. Disponible en: <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=4578>
28. María Á, Díaz G, Atuesta Bustos JE, Bernal Ulloa SM, Jaramillo LC. Generalidades de la producción de embriones bovinos *in vitro* Overview of the production of bovine embryos *in vitro* Panorâmica da produção de embriões bovinos *in vitro*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 2013;
29. La tecnología, la globalización y el futuro del desarrollo impulsado por el sector manufacturero: aprovechar las oportunidades en los países en desarrollo [Internet]. Banco mundial. 2017 [citado 13 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.bancomundial.org/es/topic/competitiveness/publication/trouble-in-the-making-the-future-of-manufacturing-led-development>
30. Ugalde JR. Biotecnologías reproductivas para el siglo XXI. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 2014;48(1).
31. Cabrera P, Fernández A. Reproducción Animal CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES: UNA HERRAMIENTA BÁSICA en la Reproducción Asistida Embryo Cryopreservation: A Basic Tool in Assisted Reproduction. *Rev Fac Cs Vets UCV*. 2006;47(2):59–69.

32. Saharrea A. Uso de la inseminación artificial para mejorar la producción de carne y leche en la ganadería tropical [Internet]. Ganaderia.com. 2016 [citado 13 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.ganaderia.com/destacado/Uso-de-la-inseminacion-artificial-para-mejorar-la-produccion-de-carne-y-leche-en-la-ganaderia-tropical>
33. Chemineau P. Vista de Una reflexión prospectiva sobre técnicas sostenibles para controlar la reproducción en mamíferos domésticos [Internet]. MASKANA, 1er CONGRESO INTERNACIONAL DE PRODUCCIÓN ANIMAL ESPECIALIZADA EN BOVINOS. 2015 [citado 29 de enero de 2023]. Disponible en: <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/649/565>
34. Métodos de Sincronización de Celo en Bovinos | Intagri S.C. [Internet]. INTAGRI. 2018 [citado 13 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.intagri.com/articulos/ganaderia/metodos-de-sincronizacion-de-celo-en-bovinos>
35. Delgado A. Evaluación de la sincronización de celo en vacas y vaconas Brahman en la Hacienda Don Manuel [Internet]. Universidad Agraria del Ecuador; 2020 [citado 29 de enero de 2023]. Disponible en: <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/DELGADO%20MENDEZ%20ALEXIS%20FARID.pdf>
36. Blondin P. Status of embryo production in the world. *Animal Reproduction (AR)* [Internet]. 26 de julio de 2018 [citado 13 de febrero de 2023];12(3):356–8. Disponible en: <http://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6030f7783717068b4603>
37. Pérez-Sandoval L, Dubeibe-Marín D, Chávez-Rodríguez A, García-Jiménez J, Velasco-Acosta D, Pérez-Sandoval L, et al. Respuesta superovulatoria en vacas donantes Brahman usando ablación folicular previo a protocolos de superovulación. *Rev MVZ Cordoba* [Internet]. 2019 [citado 29 de enero de 2023];24(2):7203–8. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682019000207203&lng=en&nrm=iso&tlng=es

38. Trigal B, Gómez E, Caamaño JN, Muñoz M, Moreno J, Carrocera S, et al. In vitro and in vivo quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology* [Internet]. 15 de octubre de 2012 [citado 13 de febrero de 2023];78(7):1465–75. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22925642/>
39. Mantilla M. Fecundación in vitro como alternativa para el mejoramiento genético en bovinos [Internet]. [Riobamba]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2012 [citado 29 de enero de 2023]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2104/1/17T1102.pdf>
40. Fernández JVR, Gallardo HÁ, Duarte DU, Islas AF, Pelayo MAA, Utrera ÁR, et al. Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino: cinco décadas de investigación en México. *Rev Mex Cienc Pecu* [Internet]. 9 de noviembre de 2021 [citado 13 de febrero de 2023];12(0):39–78. Disponible en: <https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/5918>
41. Alejandra M, Silva M, Lucerina &, Pimentel A. Mejoramiento genético en bovinos a través de la inseminación artificial y la inseminación artificial a tiempo fijo. *RIAA*, ISSN-e 2145-6453, Vol 8, N° 2, 2017, págs 247-259 [Internet]. 2017 [citado 29 de enero de 2023];8(2):247–59. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6285365&info=resumen&idoma=SPA>
42. Beneficios del genotipado en el ganado vacuno lechero [Internet]. *rumiNews*. 2020 [citado 13 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://rumiantes.com/beneficios-genotipado-ganado-vacuno-lechero/>
43. Genómica [Internet]. *SCAIGENÓMICA*. 2022 [citado 13 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.scai.uma.es/areas/ccvi/gen/gen.html>
44. Pena R, Estany J. Capítulo 1-La genómica y las técnicas de genotipado masivo. 2022 [citado 29 de enero de 2023]; Disponible en: www.ensembl.org/Sus_scrofa
45. Oyuela LA, Jiménez C. Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* [Internet]. 1 de septiembre de 2010 [citado 29 de enero de 2023]. Disponible en: <http://www.revista.unl.edu.ve/index.php/revista>

- 2023];57(3):159–67. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/remvez/article/view/18237>
46. Hm J. 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals World embryo industry grows despite the Pandemic. IETS [Internet]. 2021 [citado 14 de febrero de 2023]; Disponible en: www.iets.org/Committees/Data-Retrieval-Committee
 47. The International Embryo Technology Society (IETS) > Publications > IETS Manual [Internet]. IETS. 2021 [citado 14 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.iets.org/Publications/IETS-Manual>
 48. Naranjo F. Transferencia de embriones del ganado criollo lechero tropical [Internet]. [Veracruz]: Colegio de postgraduados institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas; 2014 [citado 29 de enero de 2023]. Disponible en: http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/10521/2801/1/Naranjo_Chac on_F_MC_Agroecosistemas_Tropicales_2014.pdf
 49. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (artículo) | Khan Academy [Internet]. Khan Academy. 2023 [citado 2 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
 50. Gatica C, Alomar D. Variantes genéticas de beta caseína bovina: implicancia en la producción, características tecnológicas de la leche y la salud humana. Gatica & Alomar / Agro Sur. 2017;45(3):29–35.
 51. Mao F, Leung WY, Xin X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. BMC Biotechnol. 9 de noviembre de 2007;7.
 52. López E, Vásquez N. Determinación del sexo y genotipificación del gen de la k-caseína en embriones bovinos. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias [Internet]. 2004 [citado 29 de enero de 2023];17(3):231–40. Disponible en: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/rccp/article/view/323945>

53. Palma G, Bream G. Transferencia de Embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina. 1ª ed. Ed. Hemisferio Sur S.A., editor. Vol. 1. Buenos Aires; 1993.
54. Mendizabal A. Presente y futuro de las técnicas de obtención de ADN embrionario para el diagnóstico genético preimplantacional (PGT). Universidad Europea [Internet]. septiembre de 2022 [citado 14 de febrero de 2023]; Disponible en: <http://titula.universidadeuropea.com/handle/20.500.12880/2715>
55. Postiglioni A, Larocca C, Carbo A, Fernández A, Llambí S, Kelly L, et al. Determinación del sexo por amplificación del ADN en embriones bovinos pre-transferencia. Veterinaria (Montevideo) [Internet]. 1 de diciembre de 1994 [citado 14 de febrero de 2023];29(124):4–9. Disponible en: <https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/603>
56. Woodford K. A2 milk, farmer decisions, and risk management [Internet]. Christchurch; 2007 [citado 30 de enero de 2023]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/27814502_A2_milk_farmer_decisions_and_risk_management
57. Pons Fita A. Determinación de la frecuencia del alelo A2 de la beta-caseína (CSN2) en pajillas de toros de la raza Holstein. DUGIDocs [Internet]. 2015 [citado 14 de febrero de 2023]; Disponible en: <https://dugidoc.udg.edu/handle/10256/12189>
58. Duifhuis T, Ayala M, Morales A, Gayosso A; Ponce R, Becerril C. Frecuencias genotípicas y alélicas de la B-caseína en el bovino Criollo Lechero Tropical de México. Archivos de Zootecnia, Redalyc [Internet]. 2016 [citado 14 de febrero de 2023];65(251):409–11. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49549092019>
59. Semex [Internet]. 2022 [citado 30 de enero de 2023]. Disponible en: <http://www.semex.com/i?lang=sp&page=a2-article.html>
60. Alelo [Internet]. National Human Genome Research Institute. 2023 [citado 14 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Alelo>

61. Betancourth JF, Cáceres G. G. Superovulación y transferencia de embriones en vacas lecheras utilizando dos protocolos hormonales [Internet]. Zamorano. El Zamorano; 2011 [citado 2 de febrero de 2023]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11036/82>
62. Andino Nájera PR. Evaluación de dos programas de superovulación en vacas lecheras. LA Referencia. 2014;
63. Chuga W, Martínez R, Cerón S, Jativa D, Chamorro B, Chirán G, et al. Transferencia de embriones en bovinos en la provincia de Carchi. Sathiri. julio de 2021;16(2):98–106.
64. Proteínas correctas replicando las A2A2 [Internet]. geneSTream. 2018 [citado 14 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.sergen.uy/administrador/pdf/geneSTream-A2A2-Spanish-web.pdf>
65. Ardila A. Programa de mejoramiento genético para características económicas en razas cebuinas lecheras [Internet]. SciELO Revista de medicina veterinaria. 2010 [citado 14 de febrero de 2023]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542010000100002
66. Genética Ganadera - Gencorpe [Internet]. Gencorpe, S.L. 2018 [citado 14 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.gencorpe.com/genetica/>
67. Valdiviezo F. Efecto de la calidad y cantidad de embriones bovinos en respuesta a dos protocolos para superovulación. [Santo Domingo]: Espe; 2017.

16. ANEXOS

Anexo 1 Aval de traducción

Anexo 2. Bibliografía del tutor de tesis

1.- DATOS PERSONALES:

Nombre: Molina Cuasapaz Edie Gabriel

Lugar y fecha de Nacimiento:

Quito, 12 de julio 1990

Edad: 32 años

Género: masculino

Nacionalidad: ecuatoriano

Dirección Domiciliaria: Pichincha, Quito, Solanda Av. Mariscal Sucre S25-225 y Alfredo Escudero

Teléfono(s): 022964757 / 0985728986

Cédula de identidad: 1722547278

Tipo de sangre: O positivo

Estado Civil: soltero

Personas con discapacidad: N.º de carné del CONADIS: NO POSEE



2.- INSTRUCCIÓN FORMAL:

| Nivel de Instrucción | Nombre de la institución educativa | Título obtenido | Número de registro Senescyt | Lugar (país y ciudad) |
|----------------------|--|---|-----------------------------|-----------------------|
| Tercer nivel | Universidad Central del Ecuador | Médico Veterinario Zootecnista | 1005-2016- 1684132 | Ecuador |
| Cuarto nivel | Universidad politécnica de Valencia Universidad Autónoma de Barcelona | Máster en Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción | 7241137679 | España |

DECLARACIÓN: DECLARO QUE, todos los datos que incluyo en este formulario son verdaderos y no he ocultado ningún acto o hecho, por lo que asumo cualquier responsabilidad.

Anexo 3. Bibliografía del autor

DATOS PERSONALES**NOMBRES:** Luis Miguel Salguero Zamora**CÉDULA:** 1804415055**LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO:** 16 de noviembre de 1994**ESTADO CIVIL:** SOLTERO**DIRECCIÓN:** Provincia De Tungurahua Cantón Tisaleo**TELÉFONO:** 0939978052**E-MAIL:** luis.salguero5055 @utc.edu.ec**PREPARACIÓN ACADÉMICA****ESTUDIO PRIMARIO:** JUAN LEON MERA LA SALLE**ESTUDIO SECUNDARIOS:** ANIBAL SALGADO RUIZ**ESTUDIOS SUPERIOR:** UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI-MEDICINA
VETERINARIA- CURSANDO NOVENO NIVEL.

Anexo 4 Cronograma de actividades

| CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES | Noviembre | | | | Diciembre | | | | Enero | | | | Febrero | | | |
|--|-----------|---|---|---|-----------|---|---|---|--------|---|---|---|---------|---|---|---|
| | Semana | | | | Semana | | | | Semana | | | | Semana | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Presentación del anteproyecto | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Elaboración del marco teórico de la tesis | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Elaboración del marco teórico de la tesis | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Realización de metodología | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Selección y genotipificación de animales, experimento de la investigación, superovulación, genotipificación de embriones | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Resultados del laboratorio, complementación del trabajo de investigación | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Análisis e interpretación de resultados | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Elaboración del proyecto final de investigación | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Presentación del proyecto a los lectores | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Predefensa | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Auditoria Académica | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Defensa | | | | | | | | | | | | | | | | |

Anexo 5. Resultados genotipificación vacas donantes



VetNAAT

Veterinary Nucleic Acids Amplification Testing



Life Science Initiative

Investigación, Educación & Desarrollo



LABORATORIO
CLÍNICO E INMUNOLÓGICO
INMUNOLAB

28/11/2022

1. Genotipificación de la β -Caseína de la leche

Informe de resultados

| | | | | | |
|--------------|----------------------|-------------|--------------|------------|------------|
| Propietario: | Sr. Holguer Salguero | Hacienda: | La Esperanza | Código: | ECX097 |
| Dirección: | Chilco La Esperanza | Cantón: | Tisaleo | Provincia: | Tungurahua |
| RUC | 1801118725001 | mail: | | Celular: | |
| Especie: | Bovina | # muestras: | 4 | Asesor: | |

| Número | Identificación muestra | Código | Tipo de muestra | Genotipo |
|--------|------------------------|--------|-----------------|----------|
| 1 | Tamara | ED0082 | SANGRE | A1A2 |
| 2 | Flor | ED0083 | SANGRE | A1A2 |
| 3 | Marcela | ED0084 | SANGRE | A1A1 |
| 4 | Jovita | ED0085 | SANGRE | A1A2 |

Los resultados fueron obtenidos a través de la genotipificación de la β -Caseína de la leche mediante la técnica de PCR cuantitativa.



Firmado electrónicamente por:
EDIE GABRIEL
MOLINA
CUASAPAZ

MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.

Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787



Firmado electrónicamente por:
DAVID ALEJANDRO
ORTEGA PAREDES

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.

Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635



Dr. Galo Leoro Monroy

Médico-Director
02 2 239379

Somos referentes en servicios de diagnóstico molecular, implementando nuevos procesos, acorde a los avances biotecnológicos para garantizar la confiabilidad de nuestros resultados.

Anexo 6. Resultados genotipificación de los embriones.



VetNAAT

Veterinary Nucleic Acids Amplification Testing



Life Science Initiative

Investigación, Educación & Desarrollo



LABORATORIO
CLÍNICO E INMUNOLÓGICO
INMUNOLAB

01/02/2023

2. Genotipificación de la β -Caseína de la leche

Informe de resultados

| | | | | | |
|--------------|----------------------|-------------|--------------|------------|------------|
| Propietario: | Sr. Holguer Salguero | Hacienda: | La Esperanza | Código: | ECX098 |
| Dirección: | Chilco La Esperanza | Cantón: | Tisaleo | Provincia: | Tungurahua |
| RUC | 1801118725001 | mail: | | Celular: | |
| Especie: | Bovina | # muestras: | 4 | Asesor: | |

| Número | Identificación muestra | Código | Tipo de muestra | Genotipo |
|--------|------------------------|--------|-----------------|----------|
| 1 | Jovita x Tipper 1 | ET001 | TROFOBLASTO | A1A2 |
| 2 | Jovita x Tipper 2 | ET002 | TROFOBLASTO | A1A2 |
| 3 | Jovita x Tipper 3 | ET003 | TROFOBLASTO | A2A2 |
| 4 | Flor x Tipper 1 | ET004 | TROFOBLASTO | A1A2 |
| 5 | Flor x Tipper 2 | ET005 | TROFOBLASTO | A2A2 |
| 6 | Flor x Tipper 3 | ET006 | TROFOBLASTO | A1A2 |

Los resultados fueron obtenidos a través de la genotipificación de la β -Caseína de la leche mediante la técnica de PCR cuantitativa.



Firmado electrónicamente por:
**EDIE GABRIEL
MOLINA
CUASAPAZ**

MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.

Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787



Firmado electrónicamente por:
**DAVID ALEJANDRO
ORTEGA PAREDES**

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.

Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

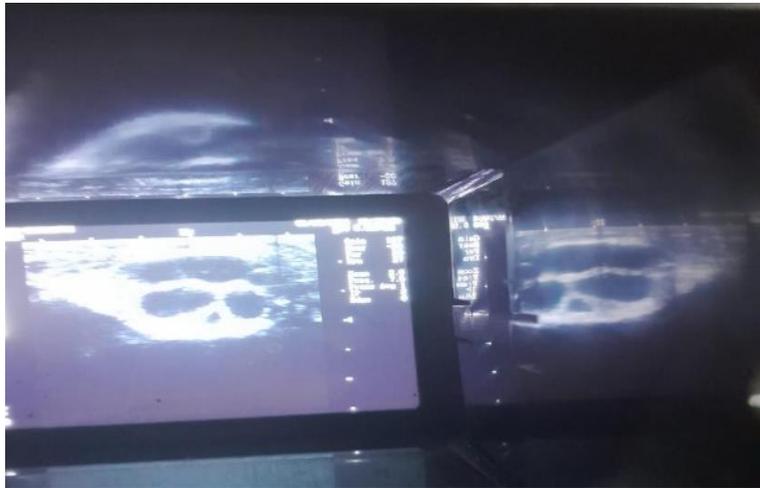
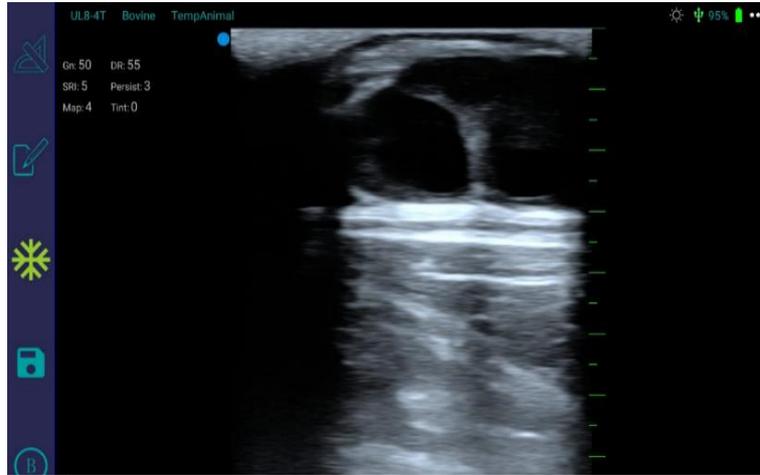


Dr. Galo Leoro Monroy

Médico-Director
02 2 239379

Somos referentes en servicios de diagnóstico molecular, implementando nuevos procesos, acorde a los avances biotecnológicos para garantizar la confiabilidad de nuestros resultados.

Anexo 7. Ecografía foliculos.



Anexo 8. Fotografías.

Fotografía 1. Selección de animales Fotografía 2. Animales seleccionados mediante registros.



Fotografía 3 Toma de muestras para genotipificación de beta caseína A2A2 Tgenetics Tipper.



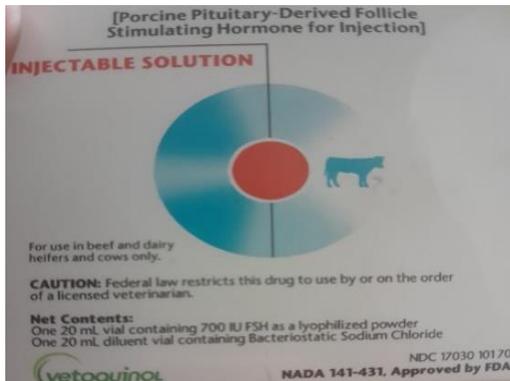
Fotografía 5. Jovita y flor vacas donantes



Fotografía 6. Inicio del protocolo de superovulación



Fotografía 7. Hormona principal Folltropin-V



Fotografía 8. Retiro de CIDE



Fotografía 9. Inseminación de las vacas donantes.



Fotografía 10. Lavado y recolecta de embriones.



Fotografía 11. Lavado y recolecta de embriones.



Fotografía 12. Lavado y recolecta de embriones.



Fotografía 13. Recuperación de embriones.



Fotografía 14. Extracción de líquido amniótico y atrapada de los embriones.



Fotografía 15. Hacienda la Esperanza.



Fotografía 16. Lugar de trabajo.



Anexo 9 registros de animales sometidos a pruebas de genotipificación

LA ESPERANZA

| | | |
|---|------------------------|--------------------|
| Nombre: Flor | Raza: Jersey | |
| Nacimiento fecha: 2/01/2020 | Padre: Fizz (67060052) | |
| Arete: 433 | Madre: Rejina (383) | |
|  | Vacunación | |
| | Fecha | Contra |
| | 20/5/2020 | Brucella RB-51 |
| | 26/9/2020 | (R) Brucella RB-51 |
| | 14/8/2021 | (R) Brucella RB-51 |
| | | |
| | | |

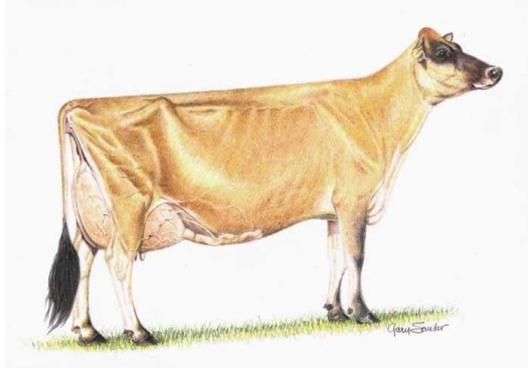
REGISTRO DE SALUD

| FECHA | DIAGNOSTICO VETERINARIO |
|------------|---|
| 3/11/2021 | Inseminada con Got Maid (119407594) |
| 3/1/2022 | Inseminada con Got Maid (119407594) |
| 21/02/2022 | Chequeo preñada |
| 10/10/2022 | Parto Hembra |
| 16/11/2022 | Folículo ovario |
| | Derecho: Grado 10 Izquierdo: Grado 5 |
| | |
| | |
| | |

LA ESPERANZA

| | |
|-----------------------------|----------------------------|
| Nombre: Marcela | Raza: Jersey |
| Nacimiento fecha: 1/11/2019 | Padre: Barnabas (67642492) |
| Arete: 434 | Madre: Dinners (2346) |

Vacunación



| Fecha | Contra |
|-----------|--------------------|
| 20/5/2020 | Brucella RB-51 |
| 26/9/2020 | (R) Brucella RB-51 |
| 14/8/2021 | (R) Brucella RB-51 |
| | |
| | |
| | |
| | |

REGISTRO DE SALUD

| FECHA | DIAGNOSTICO VETERINARIO |
|------------|---|
| 3/11/2021 | Inseminada con Got Maid (119407594) |
| 6/1/2022 | Inseminada con Got Maid (119407594) |
| 21/02/2022 | Chequeo preñada |
| 6/10/2022 | Parto Hembra |
| 16/11/2022 | Folículo ovario |
| | Derecho: Grado 15 Izquierdo: Grado 2 |
| | Cuerpo lúteo, Izquierdo: grado 10 |
| | |
| | |
| | |
| | |

LA ESPERANZA

| | |
|-----------------------------|------------------------|
| Nombre: Jovita | Raza: Jersey |
| Nacimiento fecha: 18/2/2020 | Padre: Fizz (67060052) |
| Arete: 437 | Madre: Nela (380) |



Vacunación

| Fecha | Contra |
|-----------|----------------|
| 14/8/2021 | Brucella RB-51 |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

REGISTRO DE SALUD

| FECHA | DIAGNOSTICO |
|------------|---|
| 3/11/2021 | Inseminada con Got Maid (119407594) |
| 28/12/2021 | Chequeo preñada |
| 6/8/2022 | Parto Hembra |
| 16/11/2022 | Quiste folicular ovario Derecho |
| | Ovario Izquierdo Cuerpo lúteo grado 1, folículo grado 5 |
| | Tratamiento: Conceptal 10ml |
| | |
| | |
| | |
| | |

LA ESPERANZA

| | |
|-----------------------------|---------------------|
| Nombre: Tamara | Raza: Jersey |
| Nacimiento fecha: 24/7/2019 | Padre: Fizz |
| Arete: 424 | Madre: Lunita (360) |

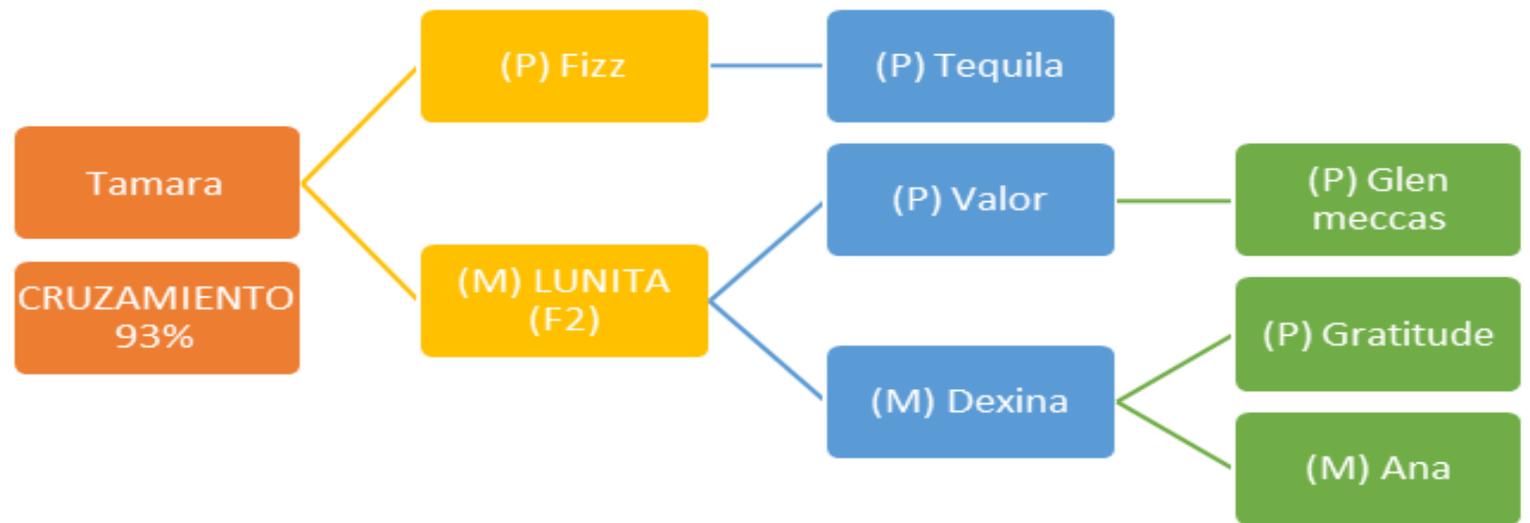
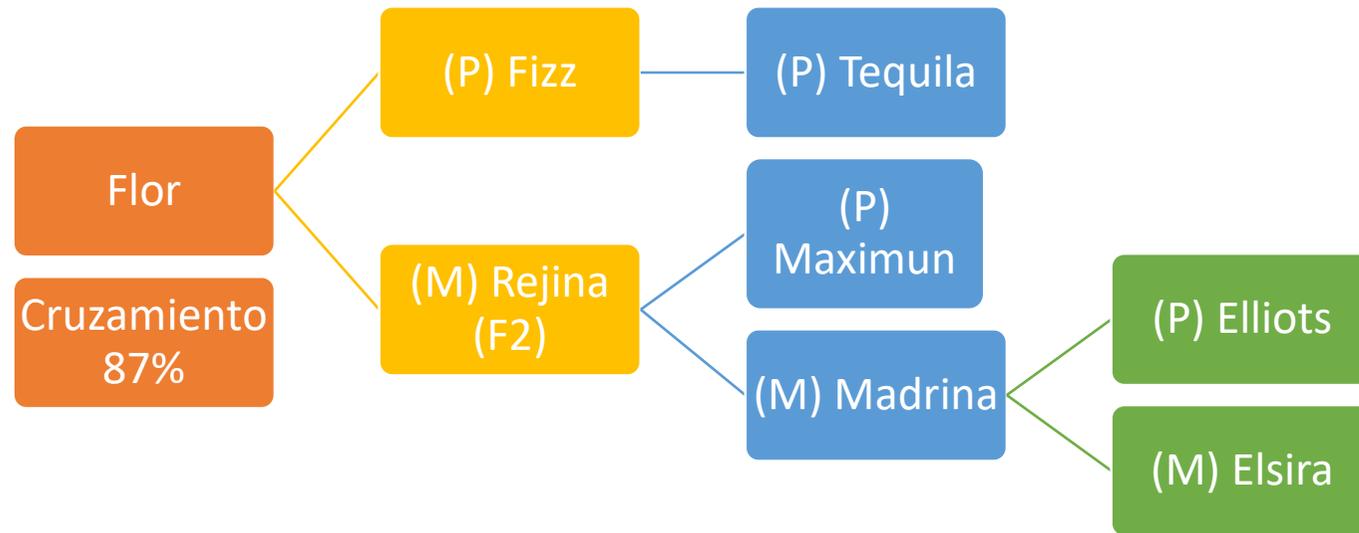


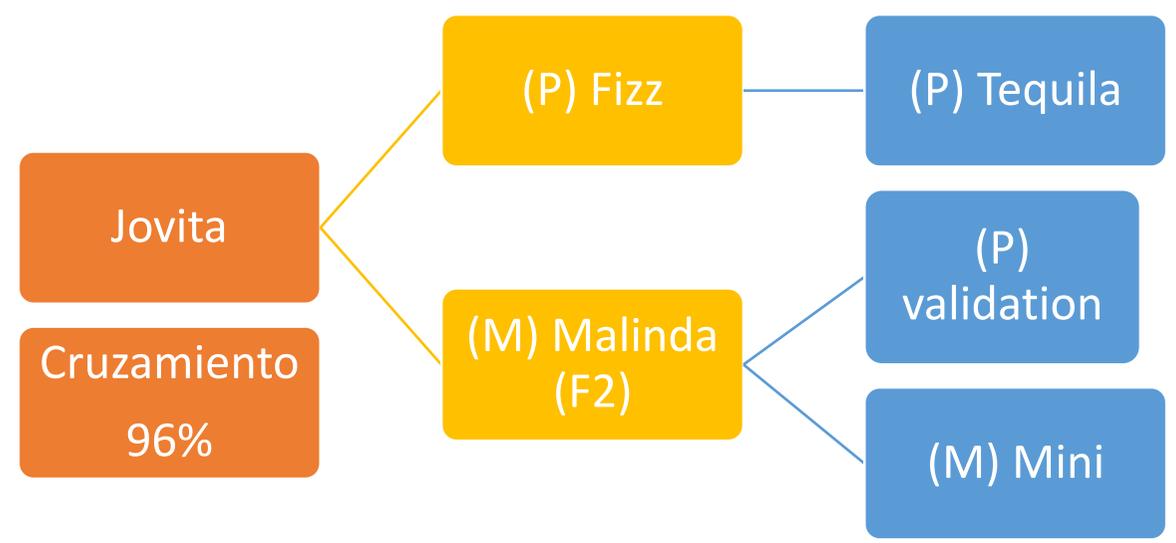
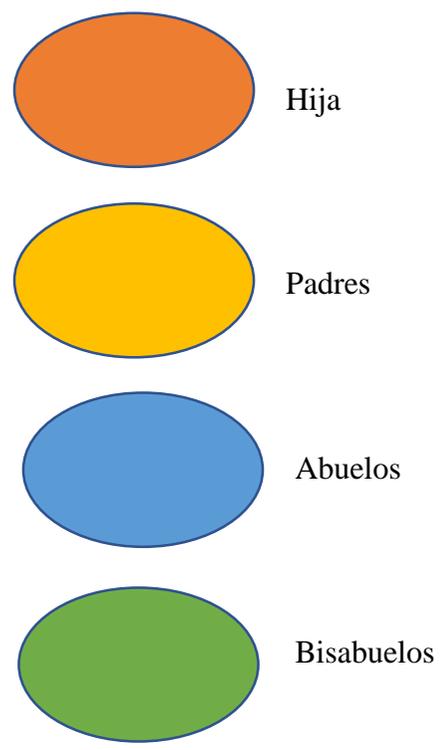
Vacunación

| Fecha | Contra |
|-----------|----------------|
| 27/7/2019 | Neumovac |
| 16/1/2020 | Brucella RB-51 |
| | |
| | |
| | |
| | |

REGISTRO DE SALUD

| FECHA | DIAGNOSTICO |
|------------|---|
| 20/11/2020 | Inseminada con Jed (28536-B) |
| 9/12/2021 | Inseminada con Achiever (67731401) |
| 13/01/2021 | Chequeo preñada |
| 13/9/2021 | Parto Macho |
| 1/1/2022 | Inseminada con Got Maid (119407594) |
| 21/02/2022 | Chequeo preñada |
| 5/10/2022 | Parto Hembra |
| 16/11/2022 | Ovario derecho: Cuerpo lúteo grado 3, folículo grado 15 |
| | Ovario Izquierdo: Acíclico |





Asociación Jersey del Ecuador

JERSEY MESTIZAJE AVANZADO

CERTIFICADO DE REGISTRO

REGISTRO 18-101009-06
NOMBRE ESPERANZA FIZZ FLOR
TATUAJE
ARETE
CRIADOR SALGUERO HOLGUER
PROPIETARIO SALGUERO HOLGUER

COLOR Café

ARETE OFICIAL (786)-0090378188

NACIDA 2020 /ENE. /02
CRUZAMIENTO 87% P.A.J.

PADRE J-KAY TEQUILA FIZZ
 USA - 67060052

TOWER VUE PRIME TEQUILA-ET
 USA - 114816452
 HARMONY CORNERS FOZZY-ET
 USA - 67052052

MADRE ESPERANZA MAXIMUM REJINA
 18-100362-06

SUNSET CANYON MAXIMUM-ET
 USA - 111950696
 ESPERANZA ELLIOTS MADRINA
 I.D. - 001679

CLASIFICACION

EN CASO DE CAMBIO DEL DUEÑO DE ESTE ANIMAL, ESTE CERTIFICADO SERA DEVUELTO AL SECRETARIO EJECUTIVO CON UNA APLICACION PARA TRANSFERIR EL CAMBIO QUE PUEDE SER REGISTRADO EN EL MISMO

CERTIFICADO DE TRANSFERENCIA

LA PROPIEDAD DE ESTE ANIMAL HA SIDO TRANSFERIDA AL REGISTRO DE LA ASOCIACION JERSEY DEL ECUADOR TAL COMO SIGUE. ESTE REGISTRO NO ES UNA GARANTIA LEGAL O EQUITATIVA DEL PROPIETARIO DEL ANIMAL

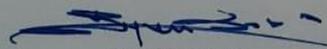
| | | | |
|--------------------------|-----------|-----------|---------------------|
| REGISTRO DEL PROPIETARIO | DIRECCION | CUENTA N° | FECHA TRANSFERENCIA |
|--------------------------|-----------|-----------|---------------------|

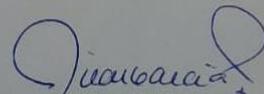


EL ANIMAL DESCRITO EN ESTE CERTIFICADO HA SIDO ACEPTADO PARA REGISTRARSE EN EL HERD BOOK DE LA ASOCIACION JERSEY DEL ECUADOR

ESTE CERTIFICADO ES EMITIDO BAJO LAS NORMAS Y CLAUSULAS VIGENTES EN EL REGLAMENTO DE REGISTRO. CUALQUIER ALTERACION QUE APAREZCA EN ESTE CERTIFICADO, SIGNIFICA UN CAMBIO NO AUTORIZADO E INVALIDA EL CERTIFICADO.

FECHA EMITIDA 2020 /SEP. /25


PRESIDENTE


SECRETARIO

Asociación Jersey del Ecuador

JERSEY MESTIZAJE AVANZADO

CERTIFICADO DE REGISTRO

ARETE OFICIAL (786)-0090378191

REGISTRO 18-101012-06

NOMBRE ESPERANZA FIZZ JOVITA

TATUAJE

P 437 H.S. COLOR Café

ARETE 437

PROPIETARIO SALGUERO HOLGUER

NACIDA 2020 /FEB. /18

CRUZAMIENTO 96% P.A.J.

PADRE J-KAY TEQUILA FIZZ
USA - 67060052

TOWER VUE PRIME TEQUILA-ET
USA - 114816452
HARMONY CORNERS FOZZY-ET
USA - 67052052

MADRE ESPERANZA VALIDATION MALINDA
18-100490-06

BRIDON VALIDATION
CAN - 11010122
ESPERANZA LEGAL MINI
002739

CLASIFICACION

EN CASO DE CAMBIO DEL DUEÑO DE ESTE ANIMAL, ESTE CERTIFICADO SERA DEVUELTO AL SECRETARIO EJECUTIVO CON UNA APLICACION PARA TRANSFERIR EL CAMBIO QUE PUEDE SER REGISTRADO EN EL MISMO

CERTIFICADO DE TRANSFERENCIA

LA PROPIEDAD DE ESTE ANIMAL HA SIDO TRANSFERIDA AL REGISTRO DE LA ASOCIACION JERSEY DEL ECUADOR TAL COMO SIGUE. ESTE REGISTRO NO ES UNA GARANTIA LEGAL O EQUITATIVA DEL PROPIETARIO DEL ANIMAL

| REGISTRO DEL PROPIETARIO | DIRECCION | CUENTA N° | FECHA TRANSFERENCIA |
|--------------------------|-----------|-----------|---------------------|
|--------------------------|-----------|-----------|---------------------|



EL ANIMAL DESCRITO EN ESTE CERTIFICADO HA SIDO ACEPTADO PARA REGISTRARSE EN EL HERB BOOK DE LA ASOCIACION JERSEY DEL ECUADOR

ESTE CERTIFICADO ES EMITIDO BAJO LAS NORMAS Y CLAUSULAS VIGENTES EN EL REGLAMENTO D REGISTRO. CUALQUIER ALTERACION QUE APAREZCA EN ESTE CERTIFICADO, SIGNIFICA UN CAMBIO N AUTORIZADO E INVALIDA EL CERTIFICADO.

FECHA EMITIDA 2020 /SEP. /25

[Signature]
PRESIDENTE

[Signature]
SECRETARIO

Asociación Jersey del Ecuador

JERSEY MESTIZAJE AVANZADO

CERTIFICADO DE REGISTRO

REGISTRO 18-101004-06
 NOMBRE ESPERANZA FIZZ TAMARA
 TATUAJE M 424 H.S.
 ARETE 424
 CRIADOR SALGUERO HOLGUER
 PROPIETARIO SALGUERO HOLGUER

ARETE OFICIAL (788)-0090378183
 COLOR Café
 NACIDA 2019 /JUL. /24
 CRUZAMIENTO 93% P.A.J.

PADRE J-KAY TEQUILA FIZZ
 USA - 67060052

MADRE ESPERANZA VALOR LUNITA
 002737

TOWER VUE PRIME TEQUILA-ET
 USA - 114816452
 HARMONY CORNERS FOZZY-ET
 USA - 67052052
 SHAN-MAR JEVON VALOR
 USA - 67100316
 ESPERANZA CARL DEXINA
 002450



CLASIFICACION

EN CASO DE CAMBIO DEL DUEÑO DE ESTE ANIMAL, ESTE CERTIFICADO SERA DEVUELTO AL SECRETARIO EJECUTIVO CON UNA APLICACION PARA TRANSFERIR EL CAMBIO QUE PUEDE SER REGISTRADO EN EL MISMO

CERTIFICADO DE TRANSFERENCIA

LA PROPIEDAD DE ESTE ANIMAL HA SIDO TRANSFERIDA AL REGISTRO DE LA ASOCIACION JERSEY DEL ECUADOR TAL COMO SIGUE. ESTE REGISTRO NO ES UNA GARANTIA LEGAL O EQUITATIVA DEL PROPIETARIO DEL ANIMAL

| | | | |
|--------------------------|-----------|-----------|---------------------|
| REGISTRO DEL PROPIETARIO | DIRECCION | CUENTA N° | FECHA TRANSFERENCIA |
|--------------------------|-----------|-----------|---------------------|

EL ANIMAL DESCRITO EN ESTE CERTIFICADO HA SIDO ACEPTADO PARA REGISTRARSE EN EL BOOK DE LA ASOCIACION JERSEY DEL ECUADOR

ESTE CERTIFICADO ES EMITIDO BAJO LAS NORMAS Y CLAUSULAS VIGENTES EN EL REGLAMENTO DEL REGISTRO. CUALQUIER ALTERACION QUE APAREZCA EN ESTE CERTIFICADO, SIGNIFICA UN CAMBIO AUTORIZADO E INVALIDA EL CERTIFICADO.

FECHA EMITIDA 2020 /SEP. /25



[Handwritten signature]

[Handwritten signature]
SECRETARIO