



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ

**FACULTAD DE CIENCIAS ZOOTÉCNICAS EXTENSIÓN CHONE
ESCUELA DE INGENIERIA ZOOTÉCNICA**

**TESIS DE GRADO
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERAS ZOOTÉCNISTAS**

**MODALIDAD:
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**TEMA:
SUPLEMENTACIÓN VITAMÍNICO Y MINERAL SOBRE LA CALIDAD DE
OVOCITOS PARA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO* EN VACAS
CEBUINAS DONADORAS**

**AUTORES:
RIVAS ALARCÓN JOSSELIN KATHERINE
RODRÍGUEZ FAJARDO JULISSA EVELYN**

**TUTOR:
Ing. WALTER FERNANDO VIVAS ARTURO M.Sc.
CHONE - MANABÍ – ECUADOR**

2021

TEMA:

**SUPLEMENTACIÓN VITAMÍNICO Y MINERAL SOBRE LA
CALIDAD DE OVOCITOS PARA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES
IN VITRO EN VACAS CEBUINAS DONADORAS**

DEDICATORIA

La vida se encuentra plagada de retos, y uno de ellos es la Universidad. Tras vernos dentro de ella, nos hemos dado cuenta que más allá de ser un reto, es una base no solo para nuestro entendimiento del campo en el que nos hemos visto inmersas, sino para lo que concierne a la vida y nuestro futuro.

A nuestras familias que han sido el pilar fundamental para poder alcanzar esta meta. A nuestros padres en especial por habernos forjado como las personas que somos en la actualidad; muchos de nuestros logros se los debemos a ellos entre los que se incluye este.

Cuando la vida te separa de un ser querido, el recuerdo de su sonrisa es la mejor manera de seguir adelante, le dedicamos a nuestro mentor Ing. Efraín Vera por habernos guiado en el transcurso de nuestra formación académica y a la vez brindándonos su afecto incondicional, en aquellos momentos que sentíamos más no poder.

AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirnos sonreír ante todos nuestros logros que son resultados de su ayuda. Gracias a nuestras familias por apoyarnos en cada decisión y proyecto que nos planteamos.

Agradecemos también a todos los miembros que integran Central Genética Gruber Zambrano 2020, por haber aceptado que se realice nuestra Tesis en tan prestigiosa institución.

Nuestro agradecimiento también va dirigido a nuestro Tutor de Tesis el MSc. Walter Fernando Vivas y Revisor de Tesis Dr. Juan Luis Cedeño, por permitirnos recurrir a sus capacidades y conocimientos científicos, sobre los temas abordados dentro de esta Tesis.

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

MSc. WALTER FERNANDO VIVAS ARTURO docente de la Facultad de Ciencias Zootécnicas, Extensión Chone de la Universidad Técnica de Manabí.

CERTIFICA

Que la presente tesis SUPLEMENTACIÓN VITAMÍNICO Y MINERAL SOBRE LA CALIDAD DE OVOCITOS PARA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO* EN VACAS CEBUINAS DONADORAS.

Ha sido realizada por las egresadas: Rivas Alarcón Josselin Katherine y Rodríguez Fajardo Julissa Evelyn bajo la dirección del suscrito, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas con disciplina y dedicación.

Chone, marzo de 2021

Lo certifico

MSc. WALTER FERNANDO VIVAS ARTURO

DIRECTOR DE TESIS

**CERTIFICACIÓN DE LA COMISIÓN DE REVISIÓN Y
EVALUACIÓN**

TESIS DE GRADO

Sometida a consideración de la Comisión de Revisión y Evaluación designada por el Honorable Consejo Directivo como requisito previo para la obtención del título de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

TEMA:

**“SUPLEMENTACIÓN VITAMÍNICO Y MINERAL SOBRE LA CALIDAD DE
OVOCITOS PARA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO* EN VACAS
CEBUINAS DONADORAS”**

**REVISADA Y APROBADA POR EL TRIBUNAL DE DEFENSA DEL TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Dr. JUAN LUIS CEDEÑO POZO

REVISOR

PRIMER MIEMBRO DEL TRIBUNAL

SEGUNDO MIEMBRO DEL TRIBUNAL

TERCER MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Chone, marzo de 2021

DECLARACIÓN SOBRE DERECHOS DE AUTOR

Dejamos constancia que el presente trabajo de titulación con el título **“SUPLEMENTACIÓN VITAMÍNICO Y MINERAL SOBRE LA CALIDAD DE OVOCITOS PARA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO* EN VACAS CEBUINAS DONADORAS”**, es inédito y es el resultado del trabajo de la investigación emprendida por sus autores.

Chone, marzo de 2021

Rivas Alarcón Josselin Katherine

C.I. 0804621662

Rodríguez Fajardo Julissa Evelyn

C.I. 2350203390

ÍNDICE

TEMA:.....	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTO	III
CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS.....	IV
CERTIFICACIÓN DE LA COMISIÓN DE REVISIÓN Y EVALUACIÓN	V
DECLARACIÓN SOBRE DERECHOS DE AUTOR	VI
ÍNDICE.....	VII
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE ILUSTRACIONES Y FIGURAS	XI
RESUMEN.....	XII
SUMARY	XIII
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- JUSTIFICACIÓN.....	3
3.- OBJETIVOS.....	5
3.1.- OBJETIVO GENERAL.....	5
3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	5
5.- MARCO TEÓRICO.	6
5.1. Bovinos existentes en Ecuador.....	6
5.2. Principales razas en Ecuador.	6
5.3. Problemas reproductivos.	7
5.3.1. Los quistes ováricos.....	8
5.3.2. Pérdida embrionaria.....	8
5.3.3. Placenta retenida.	9
5.3.4. Aborto.	9
5.3.5. Malformaciones congénitas.....	9
5.4. Alternativas de alimentación.	10
5.4.1. Ensilaje de maíz.....	10
5.4.2. <i>Tithonia diversifolia</i>	11
5.4.3. Pulpa de Totumo.....	11
5.5. Los minerales.	12
5.5.1. Deficiencia de los minerales.....	13
5.5.2. Requerimientos de minerales.....	14

5.6. Las vitaminas.....	14
5.6.1. Deficiencia de las vitaminas.	15
5.6.2. Requerimientos de las vitaminas.....	15
5.7. Maduración de ovocitos.....	16
5.7.1. Fisiología de la maduración ovocitaria.	16
5.7.2. Dinámica ovocitaria.....	16
5.7.3. Obtención de Ovocitos.....	17
5.7.4. Selección de ovocitos.....	18
5.7.5. Calidad del complejo <i>cummulus</i> -ovocito.	20
5.7.6. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos.	20
5.8. Producción <i>in vitro</i> de embriones.....	21
5.8.1. Maduración <i>in vitro</i> (MIV).	21
5.8.2. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV).	21
5.8.3. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).	22
5.9. Selección de vacas donadoras.	22
5.10. Selección de vacas receptoras.	23
6.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
6.1.- Localización y duración del experimento.	24
6.2. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES.	24
6.2.1. Para el almacenamiento de los suplementos vitamínicos-minerales:	24
6.2.2. Material y equipo de OPU para bovinos:	25
6.2.3. Material y equipo para exploración de ovocitos:	26
6.3.- Tratamiento y diseño experimental.....	27
6.4.- Composición de los productos.....	27
6.5.- Mediciones experimentales.	29
6.6.- Procedimiento experimental.	29
6.6.1.- Manejo del área.	29
6.6.2.- Alimentación a donadoras.....	30
6.6.3.- Procedimiento Experimental	30
7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
8.- ANÁLISIS ECONÓMICO.	38
9.- CONCLUSIONES.	40
10.- RECOMENDACIONES.	40
11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

12.- ANEXOS..... 46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de vacas donadoras de ovocitos en el experimento.	26
Tabla 2. Descripción de tratamientos en estudio.	27
Tabla 3. Producto Comercial N°1.	27
Tabla 4. Producto Comercial N°2.	28
Tabla 5. Producto Comercial N°3.	28
Tabla 6. Producto Comercial N°4.	28
Tabla 7. Contenido nutricional del ensilaje de maíz.	29
Tabla 8. Repuesta del suministro de minerales y complejo vitamínico sobre la producción y calidad de ovocitos.	35
Tabla 9. Relación de ovocitos totales con respecto a los viables.	35
Tabla 10. Relación de ovocitos viables con respecto a los embriones.	36
Tabla 11. Costo de tratamientos para la producción de ovocitos.	38

LISTA DE ILUSTRACIONES Y FIGURAS

Figura 1. Ubicación satelital de instalaciones Central Genética Gruber Zambrano.	24
Gráfico 2. Influencia de diferentes niveles de suplementación vitamínico, mineral sobre la producción de embriones <i>in vitro</i>	37

RESUMEN

La presente investigación se desarrolló, en la Central Genética Gruber Zambrano de la Asociación de Ganaderos de Santo Domingo (ASOGAN SD), en las siguientes coordenadas 0°15'11''S 79°10'31.3'' O, la fase experimental fue durante 120 días desde junio a octubre de 2020. Con el objetivo de determinar el efecto de la suplementación vitamínico – mineral sobre la calidad de ovocitos para producción *in vitro* de embriones en vacas cebuinas donadoras, para lo cual se utilizaron 4 productos comerciales a 9 vacas *Bos indicus* de raza Gyr lechero, las que constituyeron los cuatro tratamientos para el efecto se utilizó un diseño de medidas repetidas. En cuanto a la producción de ovocitos viables el tratamiento de mejor desempeño fue el T2, así mismo para la producción de embriones este tratamiento obtuvo la mayor respuesta, mientras que el estudio económico mostró que el T1 tuvo la mayor tasa de retorno siendo el más rentable, en este sentido es necesario el suministro de complejo vitamínico y mineral a vacas donadoras para obtener mayor producción y calidad de ovocitos como para la fertilización de los embriones.

Palabras claves. Complejo vitamínico, *Bos indicus*, fertilización *in vitro*.

SUMARY

The present investigation was developed at the Gruber Zambrano Genetic Center of the Santo Domingo Cattlemen Association (ASOGAN SD), at the following coordinates $0^{\circ} 15'11''\text{S}$ $79^{\circ} 10'31.3''\text{O}$, the experimental phase was for 120 days from June to October 2020. With the aim of determining the effect of vitamin-mineral supplementation on the quality of oocytes for in vitro production of embryos in donor zebu cows, for which 4 commercial products were used for 9 cows *Bos indicus* of the dairy Gyr breed, which constituted the four treatments for the effect, a repeated measures design was used. Regarding the production of viable oocytes, the best performing treatment was T2, likewise for the production of embryos this treatment obtained the highest response, while the economic study showed that T1 had the highest rate of return, being the most profitable. In this sense, the supply of vitamin and mineral complex to donor cows is necessary to obtain greater production and quality of oocytes as well as for the fertilization of the embryos.

Keywords. Vitamin complex, *Bos indicus*, in vitro fertilization.

1.- INTRODUCCIÓN.

En Ecuador, el ganado vacuno, consta de 4,1 millones de cabezas a nivel nacional, dividida dentro de las distintas regiones: Sierra 48,4%, Costa 42,4%, Amazonia 9,1% y Zonas no delimitadas 0,03%, del total de ganado existente en el 2018, el 69,2% son hembras y el 30,8% machos, del porcentaje de hembras del 55,6% son vacas, el 25,2% vaconas y un 19,2% terneras, la raza de ganado vacuno que predomina es la mestiza con 1,5 millones de cabezas, que representan el 37,7% de la población bovina, seguido de la raza criolla con un 23,8% (ESPAC, 2019).

El mejoramiento genético del ganado bovino en Ecuador, es una labor de constante crecimiento aunque tenga algunas limitantes para los productores ganaderos, ya que se requieren una mayor demanda de inversión, pero a la vez se logra una mejora genética acorde al sistema de producción que se tenga, actualmente los sistemas biotecnológicos que se realizan para la reproducción es mediante inseminación artificial (IA), inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), fertilización *in vitro* (FIV) y transferencia embrionaria (TE), estos sistemas han sido incluidos de manera progresiva en las ganaderías con el fin de brindar un adecuado bienestar y salud animal que ayude a la mejora reproductiva y genética y así elevar la tasa de preñez (Torres, 2014).

La baja tasa de preñez hoy en día se debe al inadecuado manejo técnico de los ganaderos, otro factor que influye es el poco uso del flushing en lo que respecta al ganado de carne ya que esto consiste en el aporte alimentario durante un corto periodo de tiempo, lo cual permitirá obtener un aumento en la tasa de ovulación que va desde un 73,7% a un 89,3%, y el efecto de la presencia del macho donde este estímulo producido sobre las hembras puede influir 3 momentos estratégicos en la vida reproductiva: la pubertad, el anestro y estro (Perez, 2004).

Ruiz (2016), expresa que un adecuado manejo de sales minerales y nutrientes influye mucho en el ámbito reproductivo tanto en su tasa de preñez como en la actividad ovárica ya que conforme las novillas alcanzan su pubertad el tracto

reproductor llega a su madurez y por tanto su funcionalidad en la actividad folicular y luteal.

Depablos (2009), manifiesta que, por tal razón se debe imponer la necesidad de suministrar suplementos alimenticios de manera prioritaria debido a la dificultad de encontrar un forraje que sea capaz de suministrar la cantidad y calidad de nutrientes que requiere el animal, por lo cual estas raciones carentes en nutrientes repercutirán en el reinicio de la actividad ovárica afectando así la productividad de su sistema.

Tanto minerales como vitaminas cumplen un rol esencial dentro del desarrollo y actividades fisiológicas asociadas a la reproducción (Simonetti, 2018), es por esto que la aplicación de este producto al inicio de un protocolo podría ser el momento indicado para iniciar una suplementación y evaluar si existen mejoras en la respuesta reproductiva luego de la aplicación del tratamiento.

Considerando las razones anteriormente expuestas y la mejora sobre la calidad de ovocitos vinculada a la dosificación de la suplementación vitamínico – mineral para mejorar la producción de embriones *in vitro*, es razonable cuestionarse ¿Qué influencia tiene la suplementación vitamínico y mineral sobre la calidad de ovocitos obtenidos de vacas cebuinas donadoras para la producción de embriones *in vitro*?

2.- JUSTIFICACIÓN.

La suplementación mineral apropiada del ganado es esencial para la salud y desempeño de los animales. La alimentación óptima del animal significa que los nutrientes individuales, tales como los minerales y vitaminas, tienen que ser provistos en la ración tanto de cantidad como en las proporciones adecuadas, ya que las interacciones individuales de algunos de ellos, pueden influenciar su disponibilidad y utilización de otros (Gonzalez, 2018).

Los embriones producidos por las vacas donantes y la transferencia a las receptoras es el trabajo básico de la transferencia de embriones, por lo cual es necesario un buen manejo de las vacas donantes para maximizar su producción, y en el caso de las receptoras que estén aptas en el momento oportuno (Ruíz, 2015).

Las actividades fisiológicas asociadas a la reproducción como presencia de ciclos estrales, gestación, lactación y crecimiento son exigentes desde el punto de vista mineral y requieren un suministro constante y adecuado de los mismos. Así, estos procesos establecen la necesidad de cuantificar los minerales requeridos ya que condiciones de subnutrición afectan considerablemente la respuesta animal (Germandia, 2007).

El principal enfoque que se tiene de la vaca donadora es que su genética sea superior a la del resto del hato, con el fin de obtener una descendencia rápida (Sarmiento, 2007), teniendo en cuenta su dieta basada en elementos minerales al momento de suplementar debido a que pueden influir en su absorción y efecto (Walenciak, 2005).

Las vitaminas A, D3 y E son compuestos orgánicos requeridos para el mantenimiento y crecimiento de los animales, las cuales no son sintetizadas por lo que tienen que aportarse en la dieta o por alguna otra vía. Las vitaminas tampoco son fuente de energía ni forman parte de las estructuras del cuerpo, pero son indispensables para el metabolismo y algunas funciones específicas en el organismo (Legninger, 2017).

La vitamina A es la más importante en la alimentación del ganado, es esencial para el crecimiento normal, reproducción, mantenimiento del tejido epitelial y desarrollo de huesos. En el aparato reproductivo de las hembras mejora el desarrollo normal de la placenta y del embrión, mejor desarrollo óseo feto, dando lugar al nacimiento de becerros sanos y la reanudación rápida del proceso reproductivo (calor). La vitamina D en presencia de la vitamina A, ayuda a prevenir el raquitismo, en la gestación cuando la vaca requiere una cantidad adicional de vitamina D, para la debida asimilación y aprovechamiento del calcio y del fosforo; ya que, estos minerales son indispensables durante la formación ósea del feto. La vitamina E por su actividad estimulante que desarrolla en la fertilidad de los sementales (toros); así como, en el comportamiento reproductivo de las hembras. Cuando las hembras han consumido abundante vitamina E durante el período de gestación; sus crías, nacerán con reservas suficientes de la vitamina; consecuentemente, durante la lactancia el becerro acumulará cantidades adicionales de vitamina E, por medio de la leche materna (calostro) (UGRJ, 2019).

El suministro de suplementos minerales y vitamínicos permite corregir desequilibrios y deficiencias de elementos minerales y vitaminas en dietas de bovinos de pastoreo. Los minerales no representan una opción nutricional en el hato de carne o leche, son obligatorios. Y la cantidad que se debe dar, por medio de los alimentos, está relacionada con la zona, tipo de ganado y calidad de las pasturas (Mendoza, 2017).

3.- OBJETIVOS.

3.1.- OBJETIVO GENERAL.

- Determinar el efecto de la suplementación vitamínico – mineral sobre la calidad de ovocitos para producción *in vitro* de embriones en vacas cebuinas donadoras.

3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Evaluar el efecto de diferentes niveles de suplementación mineral y vitamínico sobre la producción y calidad de ovocitos.
- Establecer la influencia de diferentes niveles de suplementación vitamínico – mineral sobre la producción de embriones obtenidos mediante fertilización *in vitro*.
- Determinar costo beneficio de los distintos niveles de suplementación vitamínico y mineral con relación a la producción de embriones.

5.- MARCO TEÓRICO.

5.1. Bovinos existentes en Ecuador.

En Ecuador, la cría de ganado bovino se caracteriza por tener 4,1 millones de cabezas a nivel nacional, donde su existencia es dividida dentro de las distintas regiones, tales como: Sierra 48,4%, Costa 42,4%, Amazonia 9,1% y Zonas no delimitadas 0,03%. Del total del ganado existente en el 2008, el 69,2% son hembras y el 30,8% machos, del porcentaje respectivo de hembras el 55,6% son vacas, el 25,5% vaconas y un 19,2% terneras (ESPAC, 2019).

Plaza (2016), concluye que existen alrededor de 280 mil productores de ganado bovino de carne en el país: dos tercios de estos ganaderos son pequeños productores con propiedades de 20 Ha o menos y alrededor de 28% de las haciendas tienen entre 20 y 100 Ha y se las considera operaciones ganaderas de tamaño mediano para los estándares locales, además se estima que alrededor de 3,9 millones de cabezas del hato ganadero local son animales para carne y para doble propósito predominando las actividades de producción mixtas donde el uso mayoritario son de sistemas extensivos, donde el pasto es la principal fuente de alimentos de los animales.

5.2. Principales razas en Ecuador.

Jara (2015), menciona que entre las principales razas bovinas que se destacan en el sector ganadero tenemos, para producción bovina lechera; Holstein-Friesian, Brown Swiss, Jersey, Ayrshire, Guernsey, donde los antecesores de estas razas son procedentes de Europa.

Estas razas tienen características distintivas las cuales permiten su identificación. La raza Holstein es de un mayor tamaño la cual puede llegar a pesar entre unos 675 kg, su color distintivo es blanco y negro, aunque existen también algunos ejemplares que pueden llegar a ser blancos y rojizos. La raza Ayrshire, Brown Swiss y Guernsey poseen un tamaño menor a la mencionada anteriormente a diferencia de estas la Jersey es de un tamaño menor.

La raza Brown Swiss su color varía desde un castaño grisáceo claro hasta un castaño oscuro; la Ayrshire puede ser rojiza, castaña o caoba blanco, y la Guernsey es de color marrón claro, con marcas blancas y piel amarillenta, la Jersey sus colores van desde un bayo claro, pasando por el marrón.

Para la producción de carne las razas destacadas son: Angus, Brahman, Gyr, Charolais, Simmental y entre otros cruces.

Las características principales para el ganado de razas cárnicas son las descritas a continuación: Raza Angus es de tamaño mediano, su pelaje destacable color negro o en tales casos colorado, estos animales carecen de cuernos lo que hace de este una característica destacable en los criadores; la raza Charolais tiende a ser musculosa con un peso considerable entre unos 1100 kg para los machos, destacando a nivel mundial por buen productor de carne (Avilés, 2016).

Entre las razas originarias de Asia que han sido mayormente utilizadas en cruces en los países tropicales alrededor del mundo, incluyendo las zonas cálidas de Ecuador, la raza Brahman su principal característica es la joroba en su lomo y sus orejas blandas largas, sus colores generalmente son blancos, grises y rojos, esta raza posee una capacidad notable de adaptación y supervivencia; el bovino de raza Gyr es de talla media, siendo la distinción de las otras razas debido a la conformación de su cabeza que posee una frente muy amplia y convexa haciéndola inconfundible, sus cuernos son caídos y dirigidos hacia atrás, sus orejas también son largas y colgantes terminadas en punta, su color típico es blanco moteado de rojo, habiendo estirpes con más rojo que blanco; dentro de las razas bovinas en el Ecuador, también encontramos los bovinos criollos por sus colores, entre ellos está el negro lojano, encerado, colorado y pintado, estas cumplen un rol muy importante en la vida de las comunidades campesinas, pues constituye una fuente de sustento y trabajo que benefician a estas regiones donde la crianza de otros bovinos sería insostenible (Riofrio, 2016).

5.3. Problemas reproductivos.

Los problemas reproductivos pueden presentarse con frecuencias en las ganaderías y afectar de forma dramática la eficiencia reproductiva en el hato,

algunos de los trastornos más frecuentes son los quistes ováricos, pérdida embrionaria temprana y placenta retenida (Fricke P. , 2015). Los problemas caracterizados por infertilidad, muerte embrionaria, abortos, mal formaciones congénitas y nacidos débiles son prevalentes en el ganado, ocasionando serias pérdidas económicas que son de relevancia en la industria ganadera, afectando la productividad de los hatos (Rivera H. , 2015).

5.3.1. Los quistes ováricos.

Garverick (2016), define que los quistes ováricos como estructuras llenas de fluido anovulatorio de ≥ 25 mm de diámetro que persisten en los ovarios por más de diez días, estos quistes en las vacas lecheras se mencionan como la causa principal de pérdida económica y disfunción reproductiva en operaciones. Estos quistes pueden ser foliculares o luteales, los foliculares son de paredes delgadas llenos de líquidos, estudios tempranos reportaron que las vacas que poseen quistes presentan una conducta estral intensa y prolongada (Kesler, 2015).

Aquellos quistes lúteos presentan paredes gruesas con estructuras llenas de fluido, la mayoría de quistes lúteos probablemente se forman mediante la luteinización de un quiste folicular Garverick (2016) y pueden causar infertilidad si persisten y mantienen progesterona sistémica en concentraciones que impiden el incremento de LH y la ovulación. Las vacas con excesiva condición corporal al secado están 2.5 más propensas a desarrollar quistes ováricos (Gearhart, 2016). Para el tratamiento se puede administrar GnRH lo cual induce a la ovulación de un folículo dominante que crece normalmente antes que el quiste (Fricke, 2016).

5.3.2. Pérdida embrionaria.

La pérdida de la preñez contribuye a una ineficiencia reproductiva, debido a que la fertilidad que se valora en algún punto durante la preñez, los factores asociados con la pérdida de la preñez pueden ser similares a los de la baja fertilidad, tales como la nutrición la cual tiene un impacto importante en la fertilidad de las vacas. Una revisión reciente Ferguson (2015), indica que las causas nutricionales de baja fertilidad más probables son: el manejo de energía,

excesiva alimentación de proteína y deficiencias de elementos menores y vitaminas.

5.3.3. Placenta retenida.

Durante la última fase de la gestación, el feto tiene dos partes, el feto mismo y las membranas que lo rodean o la placenta, esta misma sirve como la unidad funcional de intercambio entre los sistemas maternos y fetales, la eliminación de la placenta después de la parición depende de la separación de la porción carundular y cotiledonaria, la cual es expulsada durante dentro de las 8 horas después del nacimiento del ternero. Si la retención perdura por 8 o 12 horas o más es un indicativo anormal (Laven, 2015).

Sánchez (2015), recalca la importancia de reconocer la presencia de agentes patógenos en el tracto genital de los bovinos, debido a que el tracto genital de la hembra posee flora bacteriana en toda su extensión, a excepción del útero.

5.3.4. Aborto.

El aborto es un factor limitante del desarrollo ganadero es definido como la pérdida del producto de concepción a partir del periodo fetal, es decir a los 42 días aproximadamente, la pérdida antes de los 42 días es considerado como pérdida embrionaria. La neosporosis es una de las causas de abortos o a su vez generar terneros con lesiones cerebrales o terneros infectados congénitamente. Otra de las enfermedades infecciosas que lleva a producir el aborto es la Brucelosis bovina, esta bacteria invade la placenta produciendo una placentitis e invasión fetal ocasionando el aborto mayormente al quinto mes de gestación (Rivera, 2016).

5.3.5. Malformaciones congénitas.

Las malformaciones congénitas de etiología genética o por agentes externos pueden provocar la muerte intrauterina y el organismo en desarrollo será reabsorbido, abortado, nacer muerto, morir en el periodo neonatal, estar limitado para la reproducción (Rojas, 2015).

5.4. Alternativas de alimentación.

Para brindar un adecuado alimento se debe tener en cuenta estos puntos importantes, hay que considerar que los alimentos se clasifican por categoría dependiendo de su fuente y composición química, siendo estas establecidas como: 1. Energética (pastos, forrajes, agua, entre otros), 2. Proteica (leguminosas y concentrados), 3. Vitaminas y 4. Minerales, todos ellos reflejados en la materia seca que tienen los alimentos. Para ello, es necesario conocer las fuentes de alimentos, los niveles de producción y así como la tasa de producción animal existente (Navarro, 2015).

En toda alimentación lo primordial es el agua, ya que por cada litro de leche producido una vaca necesita beber al menos 3 litros de agua, por ende, si reduce la cantidad de agua, reduce la cantidad de leche que produce. El consumo de agua se relaciona también por la talla del animal, edad, productividad y ambiente, en general se puede estimar un consumo de agua dentro de un rango del 8 al 12% del peso del animal (Delaval, 2015).

5.4.1. Ensilaje de maíz.

Es una especie forrajera destacada porque presenta un alto volumen de forraje, un alto contenido de fibra cruda igual o superior a 18% y con un contenido de nutrientes digestibles totales superior a 70% en base seca.

Ensilar es un método de almacenaje o conservación de forraje de maíz en silos, donde se les brindan ciertas condiciones para los procesos fermentativos, el maíz como forraje es cultivado con el objetivo de ser transformado en carne y leche. La aptitud del maíz para obtener un ensilaje de calidad está estrechamente relacionada con la concentración de lignina (Fisher, 2018).

Para elaborar el ensilaje se utilizó follaje de maíz cosechado a los 90 días, donde la conservación de los silos estuvo en un periodo de fermentación de 70 días, este fue almacenado en bolsas para silos de 45 kg. Dentro de sus características nutritivas tenemos que el ensilaje es de alto contenido energético debido a que gran porcentaje de su materia seca (MS) se constituye de almidón y azúcares solubles, la fibra cruda está constituida por hemicelulosa y pentosanos; siendo

su digestibilidad de orden de un 60%, su contenido de proteína cruda (PC) varía entre 6 y 12% según la fertilidad del suelo (Jorgensen, 2015).

5.4.2. *Tithonia diversifolia*.

En los últimos años, la inclusión de forrajeras como la *Tithonia diversifolia* “Botón de oro” en dietas bovinas ha permitido reducir los costos de producción, la incidencia de enfermedades metabólicas, así como incrementar el desempeño productivo y reproductivo de los animales (Gallego, 2015). El uso de esta planta como recurso para la alimentación animal, es cada vez más frecuente, debido a su alta rusticidad, buen valor nutricional, alta digestibilidad de la materia seca y la presencia de aceites en sus flores; además de la elevada tasa de biomasa (Mahecha, 2015).

Es una alternativa para la suplementación de animales monogástricos y rumiantes, por eso se debe tener en cuenta esta forrajera para el desarrollo de los sistemas agropecuarios debido a su fácil propagación, manejo y cultivo. Sus propiedades nutricionales hacen de esta, una especie vegetal promisoría porque disminuye los costos de producción, beneficia a los productores y mantiene el rendimiento fisiológico de los animales, siendo así rentable para el sector productivo. Aquellas plantas que su edad de corte vario entre 70 y 90 días obtuvo un 85% y 90% de degradabilidad de materia seca y mejor aprovechamiento de los nutrientes (Gonzales, 2015).

La composición nutricional de la materia prima del botón de oro, de las fuentes alimenticias ofrecidas en lo estudiado tenemos lo siguiente: MS 14.5%, FDN 57.1%, FFDA 56.7%, PC 12.15%, EE 1.45%, Ca 0.58%, P 0.30%, 4305 Kcal Kg de MS (Villegas, 2016).

5.4.3. Pulpa de Totumo.

La necesidad de tener al alcance alimentos naturales ricos en nutrientes, que garanticen en gran parte del año la productividad y bajos costos de producción en los hatos ganaderos, es por eso que en la época de verano se encuentran alternativas de alimentación para bovinos como es el árbol de Totumo

(*Crescentia cujete* L.), fruto silvestre cuya fruta se usa como expectorante (Murgueitio, 2015).

La pulpa del totumo en sus características fisicoquímicas y nutricionales, puede facilitarles a los ganaderos como alternativa de alimento para el ganado, ya que tradicionalmente son alimentados con pastos naturales los cuales en épocas de sequía se escasean y su calidad nutritiva (proteína, carbohidratos y fibra) se ve reducida drásticamente, para ello se cosechan los totumos a los 6 meses de su estado de maduración fisiológica, despulpándolos con un objeto corto punzante y estrujado manual, con posterior ensilado por 8 días en tanques de plástico herméticos, revisando los estados de temperatura diaria. Flores (2015), manifiesta que, desde un punto de vista nutricional, esta es la alternativa más conveniente para la alimentación bovina porque presenta mayores contenidos de proteínas y minerales, teniendo un 11,63% de fibra, 10,56% de proteína, 41,30 % de carbohidratos.

5.5. Los minerales.

Los minerales son considerados actualmente elementos esenciales para los animales, aunque tradicionalmente fueron definidos como los nutrientes pobres de la nutrición y alimentación animal. Actualmente se ha demostrado con evidencia clínica y productiva, el importante rol metabólico de los minerales en el animal sano y productivo, como también se ha definido que elemento mineral y porcentaje del mismo es requerido para el normal funcionamiento del organismo.

Los macrominerales (calcio, magnesio, fósforo, sodio, potasio, cloro y azufre) y los oligominerales (cobre, zinc, hierro, selenio, cobalto, iodo, manganeso, molibdeno y cromo) son elementos esenciales y necesarios para transformar la proteína y la energía de los alimentos en componentes del organismo o en productos animales como leche, carne, crías, piel, lana. Además, ayudan al organismo a combatir las enfermedades, mantenimiento al animal en buen estado de salud.

Se ha considerado a los minerales como el tercer grupo limitante en la nutrición animal, siendo a su vez, el que mayor potencial y menor costo tiene para incrementar la producción del ganado. Los minerales desempeñan funciones tan importantes como ser constituyentes de la estructura ósea y dental, de tejidos blandos y líquidos corporales. Cuando el aporte de minerales en la ración no es el adecuado en calidad o cantidad se originan las deficiencias minerales, encuadradas dentro de las enfermedades metabólicas o enfermedades de la producción. Estas son responsables de importantes pérdidas económicas en los rodeos de bovinos de carne y leche (Castro, 2016).

5.5.1. Deficiencia de los minerales.

Las deficiencias de minerales en el ganado, han sido reportadas en casi todas las regiones del mundo. Los minerales más críticos para los rumiantes en pastoreo, son los siguientes: Ca, P, Na, Co, Cu, I, Se y Zn. En muchas circunstancias en Cu, Co, Fe, Se, Zn y Mo disminuyen conforme avanza la edad del forraje (Montero, 2006).

Por otra parte, Banchemo (2007), manifiesta que las deficiencias de minerales más comunes en animales en pastoreo son la de Fósforo, Sodio, Cobalto, Yodo, Selenio, Cobre, Zinc y ocasionalmente Magnesio, mientras que las deficiencias más importantes en animales alimentados con granos son de Calcio y Sodio.

Las deficiencias minerales subclínicas (sin síntomas clínicos, pero con alteraciones bioquímicas presentes) son las más graves ya que conducen a importantes pérdidas económicas por pasar desapercibidas para el productor. Las deficiencias clínicas pueden estar acompañadas por bajo porcentaje de partos, retención de placenta, mayores cifras de servicios por gestación, baja producción de leche, abortos, incremento del intervalo entre partos, menor peso al nacimiento y destete, menor porcentaje de destete, menor ganancia de peso, mayor incidencia de enfermedades infecciosas, fracturas espontáneas, diarrea, deformación de huesos y mortandad (Cseh, 2015).

5.5.2. Requerimientos de minerales.

Los requerimientos minerales en los animales son relativamente bajos para el mantenimiento (que sirven para compensar pérdidas endógenas), mientras que los de producción (crecimiento, gestación y lactancia) varían con la edad y funciones que deben desarrollar, incluyendo la naturaleza y el nivel de producción (Repetto, 2004).

Los minerales son nutrientes esenciales para todos los animales se han identificado un mínimo de 16 elementos indispensables para los rumiantes teniendo en cuenta las funciones que los mismos cumplen en el organismo. Los minerales en el organismo son completamente esqueleto, dientes, tejidos blandos, líquidos corporales, pigmentos respiratorios y están involucrados en el funcionamiento celular (Salamanca, 2010).

Los requerimientos en nutrientes en las vacas vacías varían según el peso del animal, la edad, el estado fisiológico (gestante o vacía) y el nivel de producción Álvarez (2005), y a su vez, la nutrición adecuada para cada etapa de crecimiento y de producción debe ajustarse de acuerdo a diversos factores como son: el manejo de potreros, la capacidad de carga, buena calidad y cantidad de forraje disponible, todo ello según el potencial genético del ganado que se tenga (Farías, 2006).

5.6. Las vitaminas.

Las vitaminas son compuestos orgánicos requeridos para el mantenimiento y crecimiento de los animales, las cuales no son sintetizadas por ellos, por lo que tienen que aportarse en la dieta o por alguna otra vía. Las vitaminas tampoco son fuente de energía ni forman parte de las estructuras del cuerpo, pero son indispensables para el metabolismo y algunas funciones específicas en el organismo. Las vitaminas se clasifican de acuerdo a su solubilidad en hidrosolubles y liposolubles. Las liposolubles (A, D, E y K) están formadas únicamente de carbono, hidrógeno y oxígeno, mientras que las hidrosolubles poseen además nitrógeno, azufre o cobalto, exceptuando la vitamina C e inositol. Como resultado de la síntesis microbiana, los rumiantes adultos aparentemente

no requieren de suplementación de este grupo de vitaminas; sin embargo, debido a la intensificación de los sistemas de producción (dietas altas de concentrados, uso de aditivos que aceleran la tasa de crecimiento, estrés crónico) es posible, que bajo ciertas condiciones, la síntesis microbiana de vitaminas se deprima o se incrementen los requerimientos de ciertas vitaminas del complejo B en el animal por lo que pudiera considerarse la utilización de suplementos vitamínicos (Plascencia, 2017).

5.6.1. Deficiencia de las vitaminas.

Está claramente documentado que las deficiencias de vitaminas causan severas limitaciones en la producción de carne y leche en los bovinos. Las pérdidas en la producción son más marcadas cuando estas deficiencias se presentan en las fases de crecimiento, reproducción o lactación. Además, debido a diversos factores ambientales, nutricionales, genéticos e incluso por enfermedades o interacciones farmacológicas, estas deficiencias se podrían presentar en ciertos grupos de animales (Fernandez, 2015).

En rumiantes las deficiencias vitamínicas son más comunes en pastoreo y es común la aplicación intramuscular de vitaminas A, D y E, con el objetivo de prevenir deficiencias y mejorar el estado de salud en general (Mendoza M. , 2017).

5.6.2. Requerimientos de las vitaminas.

Las vitaminas son componentes dietarios únicos y vitales, son necesarios para poder usar eficientemente otros nutrientes. Muchos procesos metabólicos son iniciados y controlados por vitaminas. Son requeridas en específica edad, raza, estado fisiológico y productivo (Bauer, 2009).

En cuanto a los requerimientos de vitaminas para los bovinos, las vitaminas A, D y E son las más importantes. Otras vitaminas como la B y la K suelen ser sintetizadas por las bacterias del rumen durante la digestión (Arteaga, 2014).

La vitamina A es necesaria para la visión, adecuado crecimiento y desarrollo, espermatogénesis, mantenimiento de tejido esquelético y epitelial incluyendo

piel y pezuña, así como también tiene efecto directo sobre la estructura y función del útero. La vitamina E ha demostrado ser esencial para la integridad y óptima función del sistema reproductivo, muscular, circulatorio y nervioso. La principal función de la vitamina D es elevar los niveles plasmáticos de calcio a niveles que permitan soportar una normal mineralización de los huesos, así como otras funciones del cuerpo (Fernández, 2015).

5.7. Maduración de ovocitos.

5.7.1. Fisiología de la maduración ovocitaria.

Los ovarios contienen folículos en diferentes estadios de desarrollo, simplemente una pequeña cantidad va a ser utilizada durante la vida reproductiva del animal. El método de maduración ovocitaria *in vitro*, ofrece la posibilidad de convertir a las hembras en productoras de gametos, igualándola cuantitativamente a los machos productores de semen para la inseminación artificial. Los ovocitos inmaduros permanecen en profase meiótica I en el interior de los folículos ováricos, cuando son removidos de éstos y cultivados *in vitro* bajo condiciones idóneas, retoman la meiosis espontáneamente y el 90% aproximadamente de ellos alcanzan la etapa de metafase II (Ahuje, 2018).

5.7.2. Dinámica ovocitaria.

La aptitud de un ovocito en ser fertilizado se relaciona al desarrollo que adquiere durante el estadio preovulatorio de la maduración meiótica. En el proceso de maduración, importantes cambios ocurren a nivel nuclear y citoplasmático, preparan al ovocito para su fertilización y el desarrollo temprano del embrión. Las comunicaciones intercelulares entre las células del *cummulus ophorus* y los ovocitos, son esenciales para la maduración del ovocito. La maduración del ovocito es definida como la reentrada en la meiosis que ocurre previo a la ovulación y la subsiguiente fertilización. La dinámica hormonal, la maduración del ovocito, se encuentra comandada por la exposición folicular de LH, hormona que promueve la maduración del ovocito y la expansión del *cummulus*, a pesar que, ni las células de *cummulus* ni el ovocito poseen receptores de la hormona

luteinizante (LH), se cree que son factores paracrinos los que intervienen en este caso (Correa, 2017) .

5.7.3. Obtención de Ovocitos.

La obtención de ovocitos permite recuperar y aprovechar folículos no ovulatorios, en condiciones fisiológicas se convertirían en folículos atrésicos, con la finalidad de aprovechar el potencial genético al máximo de una donadora por procedimiento *in vitro*. El número de ovocitos que se pueden madurar *in vivo*, se ve limitado al *feedback* de la regulación endocrina del crecimiento del folículo con el proceso de maduración (Hashimoto, 2018).

La base de la reproducción asistida es la calidad del ovocito, uno de los mayores inconvenientes enfrentados ha sido reconocer el estadio de maduración de los ovocitos, donde el citoplasma juega un importante papel. El factor limitante para la colección de Complejo Cumulus-Ovocito (COC) es el tamaño de los folículos que se extraen. Varias investigaciones realizadas con ovarios de matadero han probado una notable relación entre la calidad de ovocito y el tamaño del folículo, por consiguiente, los ovocitos recuperados de folículos mayores de 6 mm de diámetro evidenciaron desarrollo superior que los de folículos de menor tamaño (Reyes, 2017) .

La obtención de los ovocitos pueden ser dos procedimientos básicos:

- ✚ Hembras sacrificadas en el matadero, mediante la recolección de sus ovarios y la aspiración de los folículos con un diámetro entre 3 y 6 mm.
- ✚ Animales vivos, utilizando la técnica de aspiración folicular (OPU) (Palma, 2018).

5.7.3.1 Recolección de ovarios en animales post- mortem.

La obtención de ovarios provenientes de vacas sacrificadas facilita una fuente abundante de ovocitos obtenidos a bajo costo procedente de animales en diferentes estados del ciclo estral, pueden ser fertilizados, maduros y cultivados *in vitro* hasta estados avanzados del desarrollo embrionario.

Se tiene que determinar los factores externos que están implicados en la manipulación de ovocitos antes de realizar el cultivo, estos pueden afectar la

expresión de la competencia del desarrollo. La competencia de desarrollo se define como la habilidad que tiene el ovocito fertilizado de formar embriones hasta estados avanzados (blastocitos).

Dentro de los factores externos que están asociados con la manipulación de los ovarios, están la temperatura de almacenamiento de los ovarios y el tiempo de recolección de los ovocitos después del sacrificio.

La temperatura a la cual se deben transportar los ovarios desde el matadero hasta el laboratorio, oscila entre 35 y 37 °C. Los ovocitos procedentes de ovarios recogidos en el matadero se pueden obtener por dos métodos: método de aspiración con jeringa de folículos superficiales mayores de 2 mm de diámetro y el método de corte (Ramírez, 2019).

5.7.3.2. OPU (Ovum Pick-Up)

La aspiración de folículos (OPU) consiste en aspirar el contenido folicular mediante una aguja conectada a una jeringa u otro medio de succión, extrayendo el ovocito de la pared folicular, acompañada siempre de pérdida de las células de *cumulus*. Esta técnica es frecuentemente utilizada en bovinos por la rapidez del procedimiento, además de permitir seleccionar los folículos según su tamaño. Sin embargo, no se recuperan todos los ovocitos de los folículos aspirados, solo un 30 a 60%, o sea, disminuye la cantidad de ovocitos recuperados por ovarios, y solo el 45% de los ovocitos son clasificados como morfológicamente normales (Aveiga, 2015).

La OPU puede ser utilizadas en vacas no cíclicas, cíclicas, durante el primer tercio de la gestación y las que no responden a estímulos hormonales; también en animales con desórdenes reproductivos de origen no genético (Galli, 2014), en terneras y novillas prepúberes a partir de 6-8 mes de edad (Taneja, 2016).

5.7.4. Selección de ovocitos.

La selección de ovocitos se realiza en base a tres criterios: aspecto del citoplasma, diámetro y características de las células de *cumulus*. El diámetro de los ovocitos determina su capacidad para madurar, Fair (2014), de tal modo

que los ovocitos de bovinos con un diámetro inferior a 110 µm se encuentran en fase de crecimiento y no han logrado aun la capacidad de madurar.

Los ovocitos rodeados por un *cummulus* compacto formado por diversas capas de células, presentan porcentajes mayores de maduración, fecundación y desarrollo hasta blastocisto, que los que carecen de *cummulus* o los que están rodeados únicamente por la corona radiada (Stojkovic, 2013). Se ha acordado determinar una relación entre el aspecto del citoplasma y la competencia del ovocito para madurar, ser fecundado y soportar el desarrollo posterior Negano (2015), ha examinado los ovocitos que presentan un citoplasma oscuro muestran un buen potencial para el desarrollo y acumulación de lípidos, y los que presentan un citoplasma pálido tienen un escaso potencial de desarrollo y una baja densidad de orgánulos. Los ovocitos con citoplasma negro están envejecidos y presentan un menor potencial de desarrollo (Takahashi, 2016).

5.7.4.1. Calidad de ovocitos.

Se determina la calidad de ovocitos como la capacidad para producir un blastocisto dentro de un sistema de producción *in vitro*. Investigaciones realizadas previamente indican que la calidad de los ovocitos es el factor decisivo para el desarrollo al estadio de blastocisto, encadenando así con el estado fisiológico y reproductivo de los donantes, el tamaño del folículo, la extensión y la integridad de las células de cúmulos (Reyes, 2017).

La calidad del ovocito se afecta por los factores animales o ambientales. Dentro del factor de los animales se encuentran: la edad del animal, donde el mayor problema se encuentra en las vacas muy viejas o muy jóvenes, donde se puede realizar la MIV ya que existen informes de MIV a estas edades extremas e incluso se han encadenado a maduración de ovocitos recuperados de fetos, pero con un porcentaje bajo de MIV. Otro factor es la categoría del animal, es decir si son vaquillonas o vacas; el estado del ciclo estral; y la condición corporal. Por otra parte, los factores ambientales: cantidad de luz por día, la temperatura y la estación del año (Barre, 2015) .

5.7.4.2. Recolección de ovocitos.

Dentro de la producción de embriones *in vitro* comprende la recolección de ovocitos de hembras donantes, la maduración *in vitro* y la fecundación de los

ovocitos, posterior del cultivo *in vitro* hasta la etapa de mórula o blastocisto. En este periodo, ya están óptimos para ser transferidos a las hembras receptoras. La finalidad del control sanitario oficial de los embriones producidos *in vitro* para exportación es asegurar la ausencia de agentes patógenos que pueden alojar los embriones y prevenir a su vez la contaminación de las hembras receptoras y de su descendencia (OIE, 2019).

La recolección de ovocitos es el paso primordial para el empleo de los procedimientos de fertilización *in vitro* y el establecimiento siguiente de programas de producción de embriones *in vitro* (Alvarado, 2015).

5.7.5. Calidad del complejo *cummulus*-ovocito.

La calidad de los COCs que van a ser sujetos a la fertilización *in vitro* es esencial para asegurar la maduración, siguiendo su fertilización y cultivo *in vitro*. Las características morfológicas son el cimiento de diversos esquemas de clasificación, basados en estructuras celulares, en compactación, entre otras características visibles bajo estereomicroscopio (Aller, 2014).

5.7.6. Maduración *in vitro* de ovocitos.

La habilidad del ovocito para desarrollarse en embrión viable y ocasionalmente en feto saludable y normal es adquirida durante su diferenciación progresiva a través de la foliculogénesis, proceso que termina en un estadio de competencia del desarrollo, proceso que se ha nombrado “Capacitación del ovocito”. La finalidad de la MIV de ovocitos, es producirlos con calidad equiparable a los obtenidos *in vivo*. La maduración *in vitro* conforma una etapa definitiva en el rendimiento del proceso de producción de embriones *in vitro*. Los ovocitos inmaduros se mantienen en profase meiótica I dentro de los folículos ováricos, cuando son removidos de éstos y cultivados *in vitro* bajo adecuadas condiciones, se retoma la meiosis espontáneamente y el 90% aproximadamente de ellos llegan a la etapa de metafase II, y expulsan el primer cuerpo polar entre las 16 y 24 horas de iniciada la maduración, de estos es fecundado el 80% y empiezan a dividirse, al menos hasta el estadio de 2 a 4 células. En cambio, solo un 25-40%

consigue el estadio de blastocisto o blastocisto expandido después del cultivo durante 6-7 días (Palma G. , 2016).

5.8. Producción *in vitro* de embriones.

La producción de embriones *in vitro* (PIV) consta de varias etapas, cada una de las cuales puede afectar a los resultados finales del proceso. Estas etapas pueden resumirse en las siguientes: maduración *in vitro*, fecundación *in vitro* y el cultivo de los cigotos resultantes hasta blastocitos (CIV) (Ruiz & Astiz, 2015).

5.8.1. Maduración *in vitro* (MIV).

La MIV conforma una etapa definitiva en el rendimiento del proceso de PIV. De todos modos, se ha prestado poca atención, ya que si revisamos la bibliografía existente podemos comprobar que se continúa utilizando el procedimiento descrito por *Fukui y Ono*, compuesto en cultivar durante 24 horas los ovocitos inmaduros en TCM-199, suplemento con gonadotropinas (FSH y LH), suero fetal y 17 β -estradiol, a una temperatura de 38'5°C en una atmósfera con un 5 % CO₂ en aire. Actualmente, se realizan trabajos para adecuar los medios de maduración sustituyendo el TCM-199 por fluido oviductal sintético modificado (SOFm), al cambiar las condiciones de incubación en una atmósfera gaseosa con bajo contenido en O₂ y evitar la utilización de suplementos de composición indefinida (Herradón, 2017).

5.8.2. Fecundación *in vitro* (FIV).

Es una metodología que brinda la posibilidad de producir embriones genéticamente manipulados para luego ser transferirlos. Por lo cual es inevitable adquirir una fuente alternativa que permita la obtención de ovocitos maduros y embriones a gran escala, menorando así los costos, y poder seguir avanzando en el desarrollo de las biotecnologías de la reproducción. En tanto a las alternativas favorables para la ejecución de las técnicas de producción *in vitro* es el empleo de ovarios de hembras destinadas al matadero como fuente económica para obtener ovocitos maduros y embriones (Quintana, 2012).

Obtenidos los ovocitos maduros, el objetivo es conseguir la fecundación de los mismos, donde se procede a incubar junto con los espermatozoides capacitados en un medio *Tyrode* complementando con fuentes energéticas (piruvato, lactato) y albúmina sérica bovina (BSA). En los bovinos, la capacitación espermática es favorecida por la adhesión de heparina al medio (Gordon, 2014). Sin embargo, para obtener unos resultados idóneos es necesario adecuar la concentración de heparina y el número de espermatozoides para cada eyaculado concreto (Lu, 2014). Últimamente, se ha publicado un trabajo donde se confirma que el uso de una baja tensión de oxígeno durante la fecundación *in vitro* de ovocitos ovinos aumenta la calidad de blastocitos obtenidos (Leoni, 2017).

5.8.3. Cultivo *in vitro* (CIV).

En los inicios de cultivar embriones bovinos *in vitro* se encontraron con el inconveniente que estos mismos no lograban superar la etapa de 8 a 16 células (“bloqueo del desarrollo”). Para evitar aquello se utilizó el cocultivo con células somáticas o medios condicionados por dichas células complementándolas con suero. No obstante, la aplicación de estos procedimientos de cultivo generaba diversos inconvenientes ya que, al usar medios indefinidos dificulta el conocimiento de los requerimientos de los embriones en sus diversas etapas de desarrollo temprano y un elevado riesgo de incorporar patógenos durante el cultivo. Además, distintos estudios demostraron que al incorporar el suero al medio de cultivo es uno de los factores responsable del síndrome de exceso de volumen fetal y de la baja resistencia a la criopreservación de los embriones (Farin, 2017).

5.9. Selección de vacas donadoras.

Son aptas todas aquellas vacas adultas que no presentan ningún problema ginecológico, como último recurso se las puede incorporar en la transferencia de embriones (TE), se debe tener presente las condiciones anatómicas y fisiológicas requeridas, deben presentar ciclos regulares y a la vez posibilitar la palpación rectal, especialmente para ello son los animales que hayan parido de dos a tres veces y que presenten un buen estado general (Ochoa, 2016).

El manejo de las donantes es uno de los puntos críticos, si bien estas hembras no están reproductivamente bien y en un correcto estado nutricional, el programa plasmado tiende a fracasar. Circunstancialmente se debe trabajar con vacas que carezcan de un perfecto historial reproductiva o a su vez presenten algún problema reproductivo determinado (Hidalgo, 2018).

5.10. Selección de vacas receptoras.

Las vacas receptoras son de interés primordial en el programa de TE, siendo así también uno de los problemas más serios. El éxito de la TE es un adecuado mantenimiento por más costoso que sea y su estado de salud es uno de los ejes esenciales para estar en condiciones óptimas. Una buena receptora es aquella que es capaz de recibir un embrión y llegar hasta el término de la gestación, siendo capaz de parir sin grandes complicaciones y después alimentar al ternero de modo que le permita expresar su potencial genético. Resultando así de buen tamaño tanto general como reproductiva con buena capacidad lechera, cabe mencionar que su tamaño dependerá del tipo de animal (embrión) que se transferirá (Hidalgo, 2018).

6.- MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1.- Localización y duración del experimento.

Esta investigación se desarrolló, en la Central Genética Gruber Zambrano de la Asociación de Ganaderos (ASOOGAN SD), situada en el Cantón Santo Domingo, de la Provincia de los Tsáchilas, en el kilómetro 7 de la vía Santo Domingo – Quinindé con las siguientes coordenadas $0^{\circ}15'11''\text{S}$ $79^{\circ}10'31.3''\text{O}$, la fase experimental fue durante 120 días desde Junio a Octubre de 2020.

Figura 1. Ubicación satelital de instalaciones Central Genética Gruber Zambrano.



FUENTE: Google Earth

6.2. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES.

Para llevar a cabo este proceso de experimentación se requirió de los siguientes materiales.

6.2.1. Para el almacenamiento de los suplementos vitamínicos-minerales:

- Balanza digital (1 g).
- Fundas transparentes de $\frac{1}{2}$ lb.

- Marcadores.
- Tableros de identificación.

En lo que respecta a los equipos implicados en los procesos de aspiración y búsqueda de ovocitos se requirió lo siguiente:

6.2.2. Material y equipo de OPU para bovinos:

- Ecógrafo y transductor PROSOUND 2, HITACHI.
- Guía de aspiración folicular, WTA.
- Bomba de vacío digital BV-003D, WTA.
- Calentador de tubos ATI-50, WTA.
- Aguja hipodérmica N° 21 G x ½" (0,9 mm x 0,40mm) (Aspiración folicular).
- Aguja Hipodérmica N° 20 G x ½" (0,9mm x 0,38mm) (Aplicación de fármacos).
- Manguera de aspiración.
- Fundas de sonda transvaginal.
- Tubos de centrifuga de 50 ml.
- Anestésico local (Lidocaína 2%).
- Tapón de aluminio para aspiración folicular, WTA.
- Línea de aspiración folicular.
- Jeringas de 3ml.
- Alcohol 70%.
- Papel toalla.
- Guantes de látex.
- Mangas de palpar.
- Lubricante estéril.
- Baldes con agua.
- Extensión para energía de 30 m.
- Regleta eléctrica.

6.2.3. Material y equipo para exploración de ovocitos:

- Estéreo microscopio AmScope.
- Pipetas pasteur.
- Incubadora portátil de ovocitos Labmix con 10 mangos de tubos de cultivo celular.
- Calentador de tubos AT50-1, WTA.
- Pipetas cuantitativas de un solo canal de alta precisión de 0.5-10µl y 20-200µl.
- Mesa de calentamiento estándar WTA.
- Puntas para pipetas.
- Cajas petri.
- Tubos de medios.
- Filtrador.
- ABT Complete flush (medio para el lavado de ovocitos)
- Heparina
- Jeringa de 1ml y de 20ml.
- Pinzas.
- Tijera.
- Regleta eléctrica.
- Papel servilleta.

Para la realización de esta investigación se contó con un área de 1.009,52m² en lo que respecta al establo bovino, construido de cemento con una cubierta de Zinc, y adecuada ventilación e iluminación.

Las vacas donadoras permanecían dentro del establo a tiempo fijo durante el proceso de esta investigación, cada una de ellas dentro de su corral con un área de 20 m² (4x5 m) con bebedero y comedero, donde su cama estaba hecha a base de cascarilla de arroz.

Tabla 1. Características de vacas donadoras de ovocitos en el experimento.

Raza	Identificación	Peso vivo	Edad
Gyr lechero	70-18	335 kg	27 meses
Gyr lechero	431-17	335 kg	38 meses

Gyr lechero	154-18	272 kg	25 meses
Gyr lechero	03-18	359 kg	26 meses
Gyr lechero	155-5	489 kg	60 meses
Gyr lechero	513-17	381 kg	39 meses
Gyr lechero	430-17	359 kg	35 meses
Gyr lechero	425-17	342 kg	37 meses
Gyr lechero	489-17	397 kg	37 meses

6.3.- Tratamiento y diseño experimental.

El diseño experimental utilizado en esta investigación fue el diseño de medidas repetidas para reducir la variación atribuidas a las diferencias individuales y minimizar el error, utilizando un total de 9 vacas *Bos indicus* donadoras de raza Gyr, repartidas en tres tratamientos, las misma que sucesivamente luego de periodo de eliminación de los productos suministrado pasaron por cada uno de los tratamientos, cada vaca constituyó en una unidad experimental. Las 9 vacas donadoras utilizadas para esta investigación, estuvieron 30 días antes de empezar con los tratamientos T1, T2, y T3, en un tratamiento testigo.

Tabla 2. Descripción de tratamientos en estudio.

Tratamientos	Replicas	Unidades experimentales
T0 (Producto comercial N°1 125g)	3	3
T1 (Producto comercial N°1 150g + Producto comercial N°2)	3	3
T2 (Producto comercial N°3 125g + Producto comercial N°2 + Producto comercial N°4)	3	3
T3 (Producto comercial N°3 150g + Producto comercial N°2)	3	3

6.4.- Composición de los productos.

Tabla 3. Producto Comercial N°1.

Composición	Porcentaje/100g
Calcio	20%
Fósforo	10%
Sodio	9%

Magnesio	0.4%
Azufre	2%
Minerales Trazas	0.025%

Tabla 4. Producto Comercial N°2.

Composición	Porcentaje/ml
Cloruro De Calcio	0,014 g
Vitamina A	0,150 g
Vitamina E	0,750 g
Edetato de Cobre Y Zinc	22,500 ml
Selenito De Sodio	0,006 g
D-L Metionina	1,500 g
Fosfato Diácido De Potasio	0,200 g
Excipientes C.S.P	100,000 ml

Tabla 5. Producto Comercial N°3.

Composición	Porcentaje/kg
Magnesio	39 999,960 mg
Vitamina A	400 kU.I.
Vitamina D3	100 kU.I.
Vitamina E	3000 mg
Hierro	1330 mg
Selenio	3,010 mg
Fósforo	120 000,060 mg
Minerales	80 000 mg
Cobre	428 mg
Vehículo Según Formula C.S.P	1000 g

Tabla 6. Producto Comercial N°4

Composición	Porcentaje/ml
Vitamina A	500.000 Ui
Vitamina D3	75.000 Ui
Vitamina E	50 Mg
Excipientes C.S.P	1 ml

Tabla 7. Contenido nutricional del ensilaje de maíz.

Insumo	MS	PC	Grasa	Almidón	FDN	FDA
Ensilaje de maíz	35,75	7,15	4,75	26,88	47,72	28,90

FUENTE: (Martínez, 2017)

6.5.- Mediciones experimentales.

Los parámetros a evaluar durante el trabajo de investigación fueron las siguientes:

- Producción de ovocitos sobre la calidad y viabilidad de los mismos.
- Número de embriones viables.
- Análisis económico.

6.6.- Procedimiento experimental.

6.6.1.- Manejo del área.

El área para este trabajo de experimentación fue adecuada con el fin de brindar una buena estadía a las donadoras, se inició con una limpieza de los establos individuales, posterior a esto se aplicó un método de flameado para desinfección del área y así colocar cascarilla de arroz que cumpla la función de cama. También se lavó y desinfecto cada uno de los bebederos y comederos, además se colocó cal al ingreso del establo para evitar cualquier tipo de contaminante que pueda ingresar en el calzado.

Una vez iniciada la investigación se ejecutó una clasificación por sorteo, separando aquellas donadoras de raza Gyr, posterior a eso se adecuo cada uno de sus corrales identificándolas con su respectivo código, nombre y raza.

Las labores que se realizaban en el área, era la limpieza del pasillo, de comederos y bebederos, la limpieza de los establos individuales para que queden libres de estiércol se hacía en tres horarios 7am, 12pm y 6pm.

6.6.2.- Alimentación a donadoras

El alimento brindado a las vacas donadoras fue únicamente ensilaje de maíz, el mismo que se suministró dos veces al día: se les proporciono a las 7:30 a.m. una ración entre 10 y 15 kg de alimento, en la tarde a las 17:00 pm se pesó el alimento sobrante y se adicono el faltante hasta que llegar a la ración de la mañana, las vacas donadoras consumieron el ensilaje de maíz a libre demanda, proporcionado por la misma hacienda, que es propiedad de ASOGAN SD donde siembran, cultivan, pican y almacenan para facilitar los procesos de fermentación hasta ciertos niveles.

6.6.3.- Procedimiento Experimental

6.6.3.1.- Tratamiento 0

Las vacas consumieron desde el día 0 hasta el día 15 ensilaje de maíz a voluntad + Producto comercial N° 1 con una dosificación de 125g/vaca (Tabla 3).

6.6.3.2.- Tratamiento 1

Se suministró ensilaje de maíz desde el día 0 hasta el día 15 + Producto comercial N°1 con una dosificación de 150g/vaca (Tabla 3) vía oral en la alimentación diaria y un Producto comercial N°2 (Tabla 4) vía subcutánea el día 0 y el día 15 con una dosis de 1mL por cada 40kg de peso vivo.

6.6.3.3.- Tratamiento 2

Se suministró ensilaje de maíz desde el día 0 hasta el día 15 + Producto comercial N°3 con una dosificación de 125g/vaca (Tabla 5) vía oral en la alimentación, Producto comercial N°2 (Tabla 4) vía subcutánea el día 0 y el día 15 con una dosis de 1mL por cada 40kg de peso vivo y el Producto comercial N°4 (Tabla 6) vía intramuscular solo el día 0 con una dosis de 5 ml/vaca.

6.6.3.4.-Tratamiento 3

Se suministró ensilaje de maíz desde el día 0 hasta el día 15 + Producto comercial N°3 con una dosificación de 150g/vaca (Tabla 5) vía oral en la alimentación y el Producto comercial N°2 (Tabla 4) vía subcutánea el día 0 y el día 15 con una dosis de 1mL por cada 40kg de peso vivo.

El día 15 se realizó la aspiración folicular para medir la producción y calidad de ovocitos, número de embriones producidos, una vez sido realizado este procedimiento se dieron 15 días de descanso para que elimine los residuos de minerales y vitaminas, dando un total de 30 días para la primera repetición, luego se procedió a la segunda y tercera repetición de la aplicación de los productos comerciales siguiendo el diseño experimental de medidas repetidas.

Para llevar a cabo la aspiración folicular (OPU) es necesario presidir de 3 principales elementos: bomba de aspiración, equipo de ultrasonido (ecógrafo) con transductor y sistema de guía de aguja conectado al tubo colector con una presión entre 70 y 98 mm de Hg.

Previo al inicio de la OPU se procede aplicar anestesia epidural (3ml de lidocaína al 2%), de modo que, se produzca la insensibilización del aparato genital y una disminución de los movimientos peristálticos al nivel del recto, lo cual facilita tanto la localización como la manipulación de los ovarios.

Posteriormente se extraen las heces fecales del recto y se procede a la limpieza, desinfección y secado de la vulva y la región perineal con agua, desinfectante y papel descartable.

Una vez colocada la aguja en la guía del transductor se introduce a través de la vagina. La cabeza del transductor debe situarse en alguno de los dos lados del cérvix acorde al ovario a puncionar. Posteriormente se introduce la mano izquierda por el recto, fijando así el ovario contra la cabeza del transductor, lo que facilita visibilizar en la pantalla del equipo de ultrasonografía de igual modo a los folículos y la aguja. Al mismo tiempo se puede percibir el desplazamiento de la aguja, permitiendo así localizar los folículos para obtener una aspiración exitosa.

Una vez localizado el folículo a aspirar se impulsa la aguja suavemente para adentrarse a la pared vaginal y posterior a la folicular, inmediatamente obtenido esto la bomba de vacío aspira el contenido y lo deposita en los tubos de recolección.

Antes de iniciar la operación, se hace pasar por la aguja una solución de ABT Complete flush a la cual se le adiciona 30 UI/ml de heparina sódica para evitar la coagulación de la sangre, que es abundante en el tubo de recolección.

El contenido de la punción cae directamente a un tubo de recolección, el cual se mantiene a 38.5°C hasta el momento en que se procede a la búsqueda.

Después del llenado de cada tubo de fluido folicular obtenido en la OPU, se coloca en un calentador de tubos a una temperatura de 38.5°C para evitar su coagulación. El líquido colectado paso por un filtrador y con una jeringa de 20 ml se extrajo ABT Complete flush atemperado a 38.5°C, para el lavado de ovocitos. El líquido filtrado fue vertido en una caja Petri, para colocarlo en el estéreo microscopio y proceder a evaluar la calidad de ovocitos por su grado de viabilidad como es muy buena calidad (AA) buena calidad (A) y de regular calidad (B) y los no viables (Desnudos e Irregulares), se realizará una sumatoria de total de ovocitos y total de ovocitos viables. Una vez clasificados, con la ayuda de una pipeta se los colecta para ser depositados en un tubo con medio de maduración, se procede a identificar con el número de ovocitos totales y viables; indicando el tratamiento al que corresponden. Se coloca los tubos con el medio de maduración en la incubadora portátil de ovocitos, para proceder a gasificar los tubos y llevarlos al laboratorio.

Los ovocitos seleccionados se transfirieron a las placas de cultivo de 4 celdas conteniendo 400 µL del medio de maduración HTF, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1,0 µg/mL de estradiol 17-β y 10,0 µg/mL de hormona folículo-estimulante cubiertos con 200 µL de aceite mineral por celda, equilibrados en una atmósfera con 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂ con 100% de humedad relativa, a una temperatura de 39°C.

Después de que los ovocitos fueron madurados en el lapso de 24 horas, se procede a ejecutar la capacitación del semen. Para eso se usó semen congelado de toros de fertilidad comprobada, La capacitación del semen se realizó según el método de "nado hacia arriba" (*swim-up*) para lo cual se prepararon 100 mL del medio Brinster, Whitten y Whitimgham (BWW; pH 7,2) y se le agregó 1 mL del medio a los tubos de cultivo de 5 mL equilibrados en baño de María a 37°C.

Los medios y placas de fertilización se planificó antes de iniciar la capacitación del semen. El medio de maduración utilizado fue el HTF. Las placas se dispusieron de la misma manera que las placas para maduración, equiparándose durante 3 horas, antes de transferir los ovocitos al medio de fertilización, utilizando una pipeta de transferencia, estéril.

Se agregó 1 millón de espermatozoides aproximadamente por mL de medio a las placas de fertilización durante el primer minuto posterior a su capacitación y se llevaron a la incubadora a 39°C. Ésta se equilibró con 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂, la humedad relativa en un 100%, cultivándose durante un período de 20 horas.

Para transferir los ovocitos fertilizados, se extrajeron de las placas de fertilización y se les hizo un lavado en medio HTF nuevo, se evaluaron y cambiaron los ovocitos fertilizados a las placas de cocultivo, volviéndose a situar a 39°C en la incubadora, equilibrada con 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂, en un 100% de humedad relativa hasta completar 7 días. Al cuarto día, se realizó nuevamente una evaluación de los embriones, visualizándolos con el estéreo microscopio, suplementándose el medio con piruvato.

En cuanto al análisis económico se consideró los costos de alimentación, productos minerales y vitamínicos, los protocolos de fertilización y así como los materiales para la producción de los embriones versus la venta de los embriones, valores que constituyeron el costo beneficio de cada uno de los tratamientos.

Una vez concluida la investigación, para el análisis de los datos estos se procesaron en una hoja de Excel para luego analizarlos mediante el programa estadístico Infostat versión 10.6 2013 según (Rienzo, 2013).

7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El suministro de minerales es clave para el normal comportamiento reproductivo de los bovinos con tendencia a leche, de acuerdo a (Cseh, 2015). Las deficiencias minerales subclínicas son las más graves ya que conducen a importantes pérdidas económicas por pasar desapercibidas para el productor, así mismo las deficiencias clínicas pueden estar acompañadas por bajo porcentaje de partos, retención de placenta, mayor cifra de servicios por gestación, incremento del intervalo entre partos, abortos, menor peso al nacimiento y al destete; los resultados expuestos en la **Tabla 8.** demuestran que la influencia de los minerales y complejo vitamínico incrementan la producción y calidad de ovocitos, referente a la cantidad, el tratamiento de mejor respuesta fue el (T2) con $(13,67 \pm 2,98)$ obteniendo el mayor promedio con respecto al (T1) con $(12,78 \pm 2,98)$, (T3) con $(10,67 \pm 2,98)$ y (T0) con $(10,22 \pm 2,98)$ respectivamente, no se presentan diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos. En cuanto a la calidad de ovocitos podemos ver que el tratamiento (T2) en general presenta resultados favorables para esta condición, así mismo para los ovocitos desnudos e irregulares, seguido por el tratamiento (T1), (T3) y por último el tratamiento (T0) que presenta valores inferiores para calidad, así como los valores más altos para las imperfecciones. Siendo estos resultados inferiores a los obtenidos por González (2007), donde además mejoró la tasa ovulatoria $(16,6 \pm 6,84)$, $(15,5 \pm 4,18)$ y $(9,16 \pm 3,81)$; con respecto al grupo de control, la mayoría de los ovocitos colectados en los tratamientos fueron clasificados como de calidad 1 (AA) y en una menor proporción calidad 2(A) y 3 (B). Estrella (2017), en su estudio con dietas integrales, estableció que, al ejecutar la aspiración de los ovocitos de tres grupos de folículos en investigación, determinó que la cantidad de complejo *cumulus* ovocito (COC's) recuperados no existía diferencia estadística ($P > 0.05$), pese a ello, al valorar la calidad de los COC's se dispuso un porcentaje mayor de ovocitos aptos (A y B) en el grupo 2 (folículos de 4 a 8 mm) en relación al grupo 1 (folículos < 4 mm) y grupo 3 (folículos > 8 mm), se pudo obtener un 66% de ovocitos viables para la producción de embriones *in vitro* (PIV), siendo estos resultados superiores a la presente investigación.

Tabla 8. Repuesta del suministro de minerales y complejo vitamínico sobre la producción y calidad de ovocitos.

TRATAMIENTO	OVOCITOS TOTALES	AA	A	B	DESNUDOS	IRREGULARES
T0	10,22 ± 2,98 ^A	1,44±0,60 ^A	2,22±1,41 ^A	4,11±1,07 ^A	1,44±0,39 ^A	0,67±0,21 ^A
T1	12,78±2,98 ^A	2,33±0,60 ^A	5,89±1,41 ^A	3,11±1,07 ^A	1,33±0,39 ^A	0,11±0,21 ^A
T2	13,67±2,98 ^A	1,89±0,60 ^A	5,33±1,41 ^A	4,44±1,07 ^A	1,33±0,39 ^A	0,44±0,21 ^A
T3	10,67±2,98 ^A	1,56±0,60 ^A	4,33±1,41 ^A	3,56±1,07 ^A	0,89±0,39 ^A	0,33±0,21 ^A
p-valor	0,8198	0,7229	0,2859	0,8221	0,7501	0,3346

A Valores con literal similar en la misma columna no son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

En lo que respecta a la relación de ovocitos totales con ovocitos viables **Tabla 9.** se observa que el tratamiento (T2) tiene mayor promedio de ovocitos totales con (13,67±2,98), de estos (12,33±2,78) fueron viables, dando como resultado 90,1%, con relación a los ovocitos totales, mientras que para la interacción ovocitos totales viables, existe diferencia entre los tratamientos $p < 0,0001$ obteniendo la mejor interacción el tratamiento (T2) con (15,65±0,38), siendo este superior a los demás tratamientos. Estos resultados difieren a los reportados por Cattaneo & Grötter (2017), donde la recuperación de ovocitos viables fue de 46.2 y 39.5% para el grupo de control y tratados respectivamente, siendo similar en ambos tratamientos, estos autores pudieron constatar una importante variación individual en la respuesta y recuperación de ovocitos entre las vacas incluidas en el estudio.

Tabla 9. Relación de ovocitos totales con respecto a los viables.

TRATAMIENTO	OVOCITOS TOTALES	OVOCITOS VIBLES	INTERACCIÓN
T0	10,22±2,98 ^A	8,11±2,78 ^A	11,66±0,39 ^C
T1	12,78±2,98 ^A	11,33±2,78 ^A	13,69±0,36 ^B
T2	13,67±2,98 ^A	12,33±2,78 ^A	15,65±0,38 ^A
T3	10,67±2,98 ^A	9,44±2,78 ^A	11,19±0,38 ^C
p-Valor	0,8198	0,7097	$p < 0,0001$

A, B y C= Valores con literal distinta en la misma columna son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

Los resultados expuestos en la **Tabla 10.** se observa que el tratamiento (T2) tiene mayor promedio de ovocitos viables con (12,33±2,78), logrando de estos (2,89±0,78) embriones, dando como resultado 23,4% de embriones viables con relación a los ovocitos viables, mientras que para la interacción ovocitos viables embriones, existe diferencia entre los tratamientos $p = 0,0001$ alcanzando la mejor interacción el tratamiento (T2) con (3,53±0,42) siendo este, superior a los demás tratamientos (T1), (T3) y (T0) respectivamente. Resultados superiores al

presente estudio tenemos los reportados por, Fernandez (2007), que en su investigación obtuvo un total de ovocitos de (186), ovocitos fertilizados (134) (72%), mórulas 25 (13,4%) y blastocitos 5 (2,6%) mayor a nuestros resultados. Aguirre (2018), menciona que la tasa de maduración *in vitro* (porcentaje de ovocitos con cúmulos expandido del total de ovocitos puestos a madurar) para ovocitos bovinos fue 89,7% (1.308 ovocitos maduros/1.458 ovocitos colectados), la tasa de división (porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de cuatro o más células del total de ovocitos fertilizados *in vitro*) fue 82,3% para ovocitos cultivados en KSOM y 80,1% para ovocitos cultivados en medio HTF modificado (P>0,05). La tasa de desarrollo de blastocitos (porcentaje de blastocistos obtenidos del total de ovocitos fertilizados *in vitro*) fue 31,6% para embriones cultivados en KSOM y 29,5% para embriones cultivados en HTF modificado / IVC-Two e IVC-Three (P>0,05).

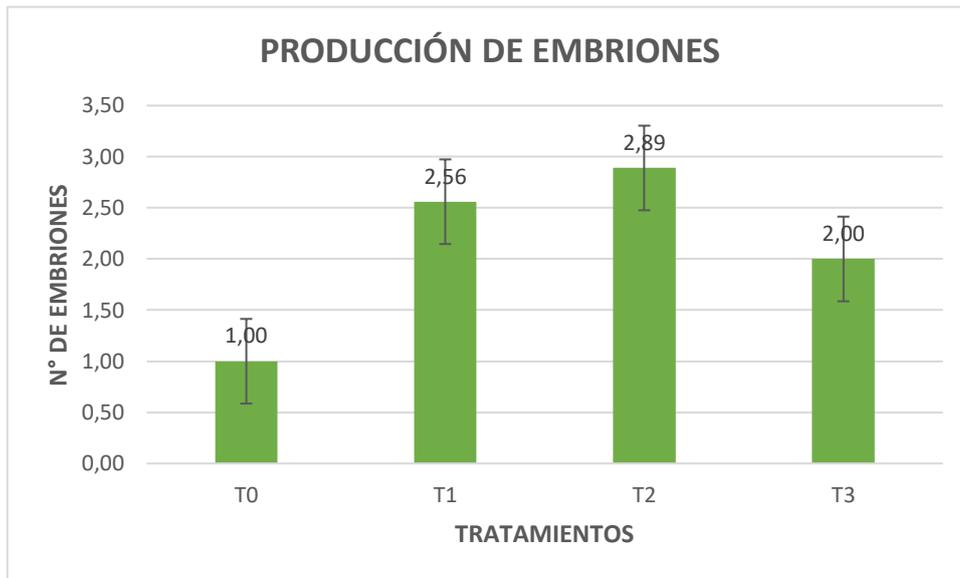
Tabla 10. Relación de ovocitos viables con respecto a los embriones.

TRATAMIENTO	OVOCITOS VIABLES	EMBRIONES	INTERACCIÓN
T0	8,11±2,78 ^A	1,00±0,78 ^A	0,79±0,42 ^B
T1	11,33±2,78 ^A	2,56±0,78 ^A	2,79±0,40 ^A
T2	12,33±2,78 ^A	2,89±0,78 ^A	3,53±0,42 ^A
T3	9,44±2,78 ^A	2,00±0,78 ^A	2,01±0,41 ^{AB}
p-Valor	0,7097	0,3542	0,0003

A, B= Valores con literal distinta en la misma columna son diferentes estadísticamente (p< 0.05).

La producción de embriones **Gráfico 2.** se observa que el tratamiento (T2) tiene un 289%, mayor producción con respecto al control, el tratamiento (T1) con 256%, (T3) con 200%, además resultó una diferencia de 34,6% entre el tratamiento (T2) y (T1), siendo el tratamiento (T0), inferior a los demás, por lo que se puede asegurar que existe influencia de los minerales y complejo vitamínico sobre la producción de embriones *in vitro*. Los resultados del presente estudio son superiores a los reportados por Urrego (2008), quien mostró que no hubo diferencia entre las variables estudiadas en su investigación respecto a la simplificación de la fertilización de ovocitos. Este mismo autor no halló diferencia estadística entre el porcentaje de ovocitos divididos y las tasas de desarrollo embrionario hasta los estadios de mórula y blastocisto en la fecundación *in vitro* convencional donde está implícita la centrifugación de los espermatozoides y la nueva propuesta metodológica en la cual se omite la centrifugación.

Gráfico 2. Influencia de diferentes niveles de suplementación vitamínico, mineral sobre la producción de embriones *in vitro*.



8.- ANÁLISIS ECONÓMICO.

El análisis económico se llevó a cabo considerando los costos de los suplementos brindados a las vacas cebuinas donadoras, el ensilaje que se les brindó a diario, tanto en el tiempo de experimentación como en sus días de descanso, así como los insumos requeridos para la producción *in vitro* de los embriones.

La **Tabla 11.** nos indica los costos de cada uno de los tratamientos en la producción de ovocitos, lo cual nos muestra que el tratamiento con menor costo fue el T0 con un total de USD 1560, cabe destacar que en este tratamiento se utilizó únicamente un suplemento mineral con un valor de USD 40 inferior a comparación a los otros tratamientos del presente estudio, siendo el tratamiento 2 (T2) el de mayor costo con USD 1660. Lo que está directamente relacionado con la repuesta de las vacas en la producción de ovocitos.

Tabla 11. Costo de tratamientos para la producción de ovocitos.

DESCRIPCIÓN	T0	T1	T2	T3
Producto comercial N°1	40	40		
Producto comercial N°2		20	20	20
Producto comercial N°3			90	90
Producto comercial N°4			30	
Ensilaje de maíz	171	171	171	171
Mano de obra (OPU y laboratorio)	450	450	450	450
Depreciación de equipos	833	833	833	833
Servicios básicos	66	66	66	66
TOTAL\$	1560	1630	1660	1630

El análisis de costos del presente estudio **Tabla 12.** demuestra que el tratamiento (T1) tiene la mayor tasa de retorno con USD 8,73 debido al menor costo en la producción de embriones viables, cuyo comportamiento fue similar a la producción de embriones del tratamiento (T2), de acuerdo a los resultados obtenidos determinamos que la inclusión de complejo vitamínico es fundamental

en la producción de ovocitos, así como en la producción de embriones viables, lo que redunda en una mayor tasa de retorno con respecto al tratamiento

Tabla 12. Relación costo – beneficio sobre la producción de embriones

TRAT.	EMBRIONES VIABLES	VALOR PAJUELA Y MATERIAL	VENTA EMBRIONES	COSTOS DE TRAT.	RELACIÓN COSTO/ BENEFICIO	C/U POR EMBRIÓN
T0	9	\$30	\$4500	\$1590	\$2,83	\$180
T1	29	\$30	\$14500	\$1660	\$8,73	\$58,27
T2	28	\$30	\$14000	\$1690	\$8,28	\$61,42
T3	27	\$30	\$13500	\$1660	\$8,13	\$62,59

9.- CONCLUSIONES.

- El nivel de suplementación vitamínico mineral con mayor rentabilidad en cuanto a la producción y calidad de ovocitos fue el Tratamiento N°2 (Producto comercial N°3+Producto comercial N°2+Producto comercial N°4) a diferencia de los demás tratamientos realizados en la investigación, deduciendo de tal modo que la inclusión de suplementos y compuestos vitamínicos minerales logran incrementar la producción de ovocitos.
- La mayor influencia de los suplementos sobre la producción de embriones obtenidos mediante fertilización *in vitro* se dio en el Tratamiento N°2 siendo este de promedio superior respecto a ovocitos viables.
- En relación a los resultados del análisis costo – beneficio tenemos que el Tratamiento N°1 (Producto comercial N°1 + Producto comercial N°2) es quien obtuvo una mayor tasa de retorno en comparación con los tratamientos T2 y T3.

10.- RECOMENDACIONES.

- Suministrar de manera adecuada niveles de suplementos vitamínicos y minerales prescritos en esta investigación en el tratamiento (T2), con el fin de alcanzar resultados favorables en la producción y viabilidad de ovocitos y embriones.
- Considerar la relación costo – beneficio para obtener una mayor rentabilidad al momento de producir embriones para generar un mayor rédito económico.
- Realizar estudios posteriores a partir de la evaluación del suministro de varios niveles de vitaminas y minerales en hembras bovinas sometidas a diferentes biotécnicas reproductivas.

11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, C. A. (2018). Medio alternativo para la producción in vitro de embriones bovinos. *Zootecnia Trop*, 5-9.
- Ahuje, M. (2018). Medio alternativo para la producción in vitro de embriones. *Zootecnia Tropical*, 3-8.
- Aller, F. (2014). Aplicación de la producción in vitro de embriones en producción animal. *INTA*, 1-4.
- Alvarado, A. (2015). Tasa de recuperación de ovocitos en vacas Holstein en descarte. *Dialnet*, 2-6.
- Álvarez, O. L. (2005). Consejos prácticos para alimentar y reproducir bien a nuestras vacas lecheras. *ACPA*, 1-4.
- Arteaga, J. (2014). Necesidades nutricionales en los bovinos. *infoCarne*, 1.
- Aveiga, S. (2015). In vitro maturation (IVM) and fertilization (IVF) of cattle ova. *Embryo Transfer Newsletter*, 6-11.
- Avilés, W. G. (2016). Razas de bovinos Ecuador . 3.
- Banchero, A. R. (2007). Deficiencia de minerales en rumiantes. *INIA*, 1-5.
- Barre, C. (2015). Evaluación de ovocitos de vaca para maduración en cultivo. *Avances en ciencias veterinarias*, 14-29.
- Bauer, D. (2009). Minerales y vitaminas en bovinos de carne. *Producción Animal*, 16-18.
- Castro, S. (2016). Deficiencias minerales en bovinos para carne. Diagnóstico, caracterización y control. *Mundo Animal*, 2-6.
- Cattaneo, L., & Grötter, L. (2017). Efecto de la suplementación de vitaminas y minerales sobre la calidad ovocitaria en vacas lecheras . *Encuentro de Jóvenes Investigadores*, 2-4.
- Correa, J. (2017). Desarrollo partenogénico in vitro con ovocitos vitrificados bovinos. *Sitio Argentino de producción animal*.
- Cseh, S. (2015). Deficiencias minerales en bovinos para carne, Diagnóstico, caracterización y control. *Producción animal*, 3-6.
- Delaval. (2015). Consumo de agua y confort animal. *Delaval*.
- Depablos, L. (2009). Suplementación mineral proteica de novillas a pastoreo en los llanos centrales de Venezuela . *Zootecnia tropical*.
- ESPAC. (2019). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua. *ESPAC 2018*.

- Estrella, C. (2017). Evaluación de la calidad de ovocitos bovinos obtenidos de folículos con tres tamaños diferentes. *MASKANA*, 2-3.
- Fair, T. (2014). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev*, 42-437.
- Farías, M. (2006). Manejo de pastos y forrajes en la ganadería de doble. *AVPA*, 2-6.
- Farin, P. (2017). Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*, 70-151.
- Ferguson. (2015). Production and reproduction in dairy cows. *Anim Feed Sci Tech*.
- Fernandez , A. (2007). Producción in vitro de embriones bovinos. *Revista de la FCV, Universidad Central de Venezuela*, 7-11.
- Fernández, C. G. (2015). Vitaminas para mejorar producción y fertilidad en vacas lecheras. *QUIMICAFARVET*, 1.
- Fernandez, M. (2015). Deficiencias de vitaminas liposolubles en bovinos. *AGROINVIC*, 2-5.
- Fisher. (2018). Quality analysis of summer – annual forages. I. Sample preparation methods and chemical characterisation of forage types and cultivars. *INIA* , 4.
- Flores, E. (2015). Evaluación de la pulpa de totumo (*Crescentia cujeteL*) ensilada en dos estados de maduración como alternativa en alimentación bovina . *Revista Unicordoba*, 48,49,50-60.
- Fricke. (2016). Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. . *Theriogenology*.
- Fricke, P. (2015). Manejando trastornos reproductivos en vacas lecheras. *ResearchGate*, 2-3.
- Gallego. (2015). Potencial forrajero *Thitonia diversifolia* Hemls. *Sistemas Silvopastoriles: Aportes a los Objetivos de Desarrollo Sostenible*, 431.
- Galli, C. (2014). Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, 1341-1357.
- Garverick. (2016). Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci*.
- Gearhart. (2016). Relationship of changes in condition score to cow health in Hosteins. *J Dairy Sci*.
- Germandia, J. (2007). Los minerales en la reproducción bovina. *Producción animal*, 3-6.

- González, E. (2007). Influencia de la suplementación en la dieta con levaduras y minerales sobre la producción de ovocitos de ovejas púberes estimuladas ováricamente . *Revista FZC*, 4-7.
- Gonzales, J. C. (2015). Características botánicas de *Tithonia diversifolia* (Asterales: Asteraceae) y su uso en la alimentación animal . *Boletín Científico*.
- Gonzalez, K. (2018). Sales mineralizadas para el ganado bovino. *Zootécnia y Veterinaria es mi pasión* , 1-5.
- Gordon, I. (2014). Laboratory production of cattle embryos. CAB International. *CAB International*.
- Hashimoto, S. (2018). Application on in vitro maturation to assisted reproductive technology. *Journal of Reproduction and Development*, 1-10.
- Herradón, P. G. (2017). Fecundación in vitro: alternativa para la mejora genética en bovinos. *Arch Latinoam Prod Anim*, 1-8.
- Hidalgo, R. (2018). Manejo de donantes y receptoras. *Reprobiotec*, 1-4.
- Jara, J. R. (2015). Análisis y aplicación de un modelo de productividad. *PUCE*, 23.
- Jorgensen. (2015). Ensilaje de maíz para el ganado 2016.
- Kesler. (2015). Ovarian cysts in dairy cattle. *J Anim Sci*.
- Laven. (2015). Bovine retained placenta: retained placenta, pathogenesis and economic loss. *Vet Rec*.
- Legninger. (2017). *Principios de Bioquímica*. Barcelona: Omega.
- Leoni, G. G. (2017). A Low Oxygen Atmosphere during IVF Accelerates the Kinetic of Formation of in vitro Produced Ovine Blastocysts. *Reprod Dom Anim*, 299-304.
- Lu, K. H. (2014). Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology*, 30-819.
- Mahecha, I. (2015). Valor nutricional del follaje de Botón de oro. *Livestock Research for Rural Development*.
- Martínez, T. (2017). Evaluación nutricional del ensilaje de maíz cosechado en cuatro etapas fenológicas elaborado con tres calibres de picado. *Zamorano*.
- Mendoza, G. (2017). Vitaminas en el ganado bovino de engorda. *Ganadería*, 3.
- Mendoza, M. (2017). Vitaminas en la producción de ganado bovino. *Producción Animal*, 3-6.
- Montero, R. (2006). Suplementación mineral en bovinos. *Ganadería*, 1.

- Murgueitio. (2015). Conferencia Agroforestería, Ganadería y medio ambiente en América Latina, XII Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. 45.
- Navarro, J. (2015). Alternativas de alimentación bovina implementadas en época seca, en el Municipio de Palagüina.
- Negano, M. (2015). In vitro fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters. *J Vet Med Sci*, 35-531.
- Ochoa, R. (2016). Transferencia de embriones en vacunos de leche. *Revista de Ciencias de la vida*, 2-6.
- OIE. (2019). *Código Sanitario para los animales terrestres*. Paris: Publications.
- Palma, G. (2016). *Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina*. Buenos Aires: Hemisferio sur.
- Palma, G. A. (2018). Producción in vitro de embriones bovinos. *Researchgate*, 13-71.
- Perez, M. (2004). Manual de crianza animales .
- Plascencia, J. (2017). Vitaminas en el ganado bovino de engorde . *Producción Animal*, 1-6.
- Plaza, M. A. (2016). Industria de Ganadería de Carne. *ESPOL*, 12.
- Quintana, M. (2012). Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros para fertilización in vitro. *Salud Animal*.
- Ramírez, O. (2019). Recolección de Oocitos para procedimientos in vitro en bovinos . *encolombia*, 1-2.
- Repetto, J. C. (2004). Carencias minerales, limitantes de la producción. *Producción Animal*, 1-5.
- Reyes, M. (2017). Maduración y fertilización in vitro de ovocitos de cerdas obtenidos por punción y corte de folículos. *Revista Salud Animal*, 1-5.
- Rienzo, J. D. (2013). Implementación de un módulo para la estimación de modelos lineales generalizados mixtos en Infostat .
- Riofrio, A. (2016). Caracterización genética de la población bovina criolla de la Región sur del Ecuador. *Animal Genetic Resources*, 94.
- Rivera, H. (2015). Prevalencia de enfermedades de impacto reproductivo en bovinos de la estación experimental de trópico del centro de investigaciones ivita. *Revista de Investigación Veterinaria Perú*, 121.
- Rivera, H. (2016). Causas frecuentes de aborto bovino. *Rev Inv Vet Perú*, 111.
- Rojas, L. (2015). Malformaciones congénitas: consideraciones sobre su presentación fenotípica . *RED VET*, 2.

- Ruíz, A. (2015). Manejo de donantes y receptoras "transferencia de embriones y biotecnología en la reproducción de las especie bovina". *Agrovetmarket*.
- Ruiz, G. (2016). Efecto de la suplementación mineral sobre el desarrollo ovarico y fertilidad en novillas Bos Tauros y Bos indicus.
- Ruiz, S., & Astiz, S. (2015). Producción in vitro de embriones (PIV) en biotecnología de la reproducción bovina. *Researchgate*, 3-9.
- Salamanca, A. (2010). Mineral supplementation for cattle production. *REDVET*, 3-11.
- Sánchez, M. (2015). Evaluación citológica y microbiológica de lavados uterinos en bovinos con problemas reproductivos . *Revista MVZ Cordoba* , 3.
- Sarmiento. (2007). El inicio de la biotecnología. *Agrovetmarket*.
- Simonetti, M. (2018). Efecto de la suplementación vitamínico mineral sobre el porcentaje de preñez en vacas inseminadas a tiempo fijo.
- Stojkovic, M. (2013). Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro Maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod*, 904-909.
- Takahashi, Y. (2016). Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. *Zygote*, 53-61.
- Taneja, M. (2016). Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol Reprod*, 206-213.
- Torres, Y. (2014). Identificación e implementación de paquetes tecnológicos en ganadería vacuna de doble propósito. Caso Manabí- Ecuador. *Scielo*.
- UGRJ. (2019). *El uso de las vitaminas A, D y E en la alimentación del ganado*. Jalisco.
- Urrego, R. (2008). Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción in vitro de embriones bovinos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 7-9.
- Villegas, G. H. (2016). *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray en vacas de mediana producción y su efecto en la producción y composición de la leche. *Sistemas Silvopastoriles: Aportes a los Objetivos de Desarrollo Sostenible*, 432.
- Walenciak. (2005). Hechos sobre transferencia embrionaria . *Agrovetmarket*.

12.- ANEXOS.

Anexo 1. Productos comerciales utilizados en la investigación.

Producto comercial N°1



Producto comercial N°2



Producto comercial N°3



Producto Comercial N°4



Anexo 2. Distribución del experimento.



Anexo 3. Colocación de suplementos minerales en el ensilaje.



Anexo 4. Aplicación de los suplementos vitamínicos minerales.



Anexo 5. Aspiración folicular (OPU).



Anexo 6. Búsqueda de ovocitos.



Análisis de la varianza

TOTAL

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
TOTAL	36	0,03	0,00	75,63

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	73,89	3	24,63	0,31	0,8198
TRAT	73,89	3	24,63	0,31	0,8198
Error	2563,11	32	80,10		
Total	2637,00	35			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=11,43061

Error: 80,0972 gl: 32

TRAT Medias n E.E.

2	13,67	9	2,98	A
1	12,78	9	2,98	A
3	10,67	9	2,98	A
4	10,22	9	2,98	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

VIABLES

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
VIABLES	36	0,04	0,00	80,84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	96,53	3	32,18	0,46	0,7097
TRAT	96,53	3	32,18	0,46	0,7097
Error	2221,11	32	69,41		
Total	2317,64	35			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=10,64072

Error: 69,4097 gl: 32

TRAT Medias n E.E.

2	12,33	9	2,78	A
1	11,33	9	2,78	A
3	9,44	9	2,78	A
4	8,11	9	2,78	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

AA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AA	36	0,04	0,00	99,53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,31	3	1,44	0,44	0,7229
TRAT	4,31	3	1,44	0,44	0,7229
Error	103,33	32	3,23		
Total	107,64	35			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,29512

Error: 3,2292 gl: 32

TRAT Medias n E.E.

1	2,33	9	0,60	A
---	------	---	------	---

2	1,89	9	0,60	A
3	1,56	9	0,60	A
4	1,44	9	0,60	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

A

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
A	36	0,11	0,03	95,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	70,44	3	23,48	1,32	0,2859
TRAT	70,44	3	23,48	1,32	0,2859
Error	570,44	32	17,83		
Total	640,89	35			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,39253

Error: 17,8264 gl: 32

TRAT	Medias	n	E.E.
1	5,89	9	1,41 A
2	5,33	9	1,41 A
3	4,33	9	1,41 A
4	2,22	9	1,41 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

B

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
B	36	0,03	0,00	84,41

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9,42	3	3,14	0,30	0,8221
TRAT	9,42	3	3,14	0,30	0,8221
Error	330,22	32	10,32		
Total	339,64	35			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,10288

Error: 10,3194 gl: 32

TRAT	Medias	n	E.E.
2	4,44	9	1,07 A
4	4,11	9	1,07 A
3	3,56	9	1,07 A
1	3,11	9	1,07 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

DESNUDOS

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DESNUDOS	36	0,04	0,00	92,86

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,64	3	0,55	0,41	0,7501
TRAT	1,64	3	0,55	0,41	0,7501
Error	43,11	32	1,35		
Total	44,75	35			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,48245

Error: 1,3472 gl: 32

TRAT	Medias	n	E.E.
4	1,44	9	0,39 A
2	1,33	9	0,39 A
1	1,33	9	0,39 A
3	0,89	9	0,39 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

IRREGULAR

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
IRREGULAR	36	0,10	0,01	164,60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,44	3	0,48	1,18	0,3346
TRAT	1,44	3	0,48	1,18	0,3346
Error	13,11	32	0,41		
Total	14,56	35			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,81753

Error: 0,4097 gl: 32

TRAT	Medias	n	E.E.
4	0,67	9	0,21 A
2	0,44	9	0,21 A
3	0,33	9	0,21 A
1	0,11	9	0,21 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

EMBRIONES

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
EMBRIONES	36	0,10	0,01	110,81

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	18,44	3	6,15	1,12	0,3542
TRAT	18,44	3	6,15	1,12	0,3542
Error	175,11	32	5,47		
Total	193,56	35			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,98774

Error: 5,4722 gl: 32

TRAT	Medias	n	E.E.
2	2,89	9	0,78 A
1	2,56	9	0,78 A
3	2,00	9	0,78 A
4	1,00	9	0,78 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

EMBRIONES

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
EMBRIONES	36	0,89	0,75	55,59

Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	172,90	20	8,64	6,28	0,0004
TRAT	18,44	3	6,15	4,46	0,0197
VIABLES	154,45	17	9,09	6,60	0,0003
Error	20,66	15	1,38		
Total	193,56	35			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,59441

Error: 1,3771 gl: 15

TRAT	Medias	n	E.E.	
2	3,53	9	0,42	A
1	2,79	9	0,40	A
3	2,01	9	0,41	A B
4	0,79	9	0,42	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,77382

Error: 1,3771 gl: 15

VIABLES	Medias	n	E.E.	
17	9,00	1	1,17	A
30	7,00	1	1,17	A B
21	7,00	1	1,17	A B
36	6,00	1	1,17	A B C
14	5,00	1	1,17	A B C D
31	5,00	1	1,17	A B C D
5	2,55	3	0,69	B C D
10	2,00	2	0,83	B C D
9	1,94	3	0,70	B C D
8	1,67	6	0,48	B C D
4	1,17	3	0,69	C D
3	1,00	1	1,17	C D
6	0,82	4	0,63	C D
7	0,67	3	0,68	C D
12	0,00	1	1,17	D
16	0,00	1	1,17	D
20	0,00	1	1,17	D
2	0,00	2	0,83	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

TOTAL

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
TOTAL	36	0,99	0,98	9,04

Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2619,83	20	130,99	114,41	<0,0001
TRAT	73,89	3	24,63	21,51	<0,0001
VIABLES	2545,94	17	149,76	130,81	<0,0001
Error	17,17	15	1,14		
Total	2637,00	35			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,45377

Error: 1,1449 gl: 15

TRAT	Medias	n	E.E.	
2	15,65	9	0,39	A
1	13,69	9	0,36	B
4	11,66	9	0,38	C
3	11,19	9	0,38	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,26452

Error: 1,1449 gl: 15

VIABLES	Medias	n	E.E.						
36	38,00	1	1,07	A					
30	33,00	1	1,07	A					
31	33,00	1	1,07	A					
20	26,00	1	1,07	B					
21	24,00	1	1,07	B	C				
17	20,00	1	1,07		C	D			
16	18,00	1	1,07			D			
14	15,00	1	1,07			D	E		
10	11,00	2	0,76				E	F	
12	10,00	1	1,07				E	F	
9	9,46	3	0,63					F	
8	9,17	6	0,44					F	G
7	8,00	3	0,62					F	G H
5	7,63	3	0,63					F	G H
6	7,34	4	0,57					F	G H
4	5,76	3	0,63					F	G H
3	4,00	1	1,07						G H
2	3,00	2	0,76						H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cantidad y costos de los productos suministrado a los tratamientos.

TRATAMIENTO	PRODUCTO	CANTIDAD	COSTO	COSTO TOTAL
0	Producto comercial N°1	16875g	40	40
	Producto comercial N°1	20250g	40	
1	Producto comercial N°2	140,0ml	20	60
	Producto comercial N°2	141,8ml	20	
2	Producto comercial N°3	16875g	90	140
	Producto comercial N°4	45ml	30	
	Producto comercial N°2	140,0ml	20	
3	Producto comercial N°3	20250g	90	110
	Producto comercial N°2	140,0ml	20	

Costo de mano de obra por aspiración.

MANO DE OBRA	COSTO
Aspiración folicular (OPU)	\$250
Búsqueda de ovocitos	\$100
Laboratorio	\$100
TOTAL	\$450

Costo de los productos suministrado a los tratamientos.

PRODUCTO	PRESENTACIÓN	COSTO
Ensilaje (Funda)	45kg	4.50
Producto comercial N°1	20kg	40
Producto comercial N°2	530ml	60
Producto comercial N°3	25kg	90
Producto comercial N°4	50ml	30