



Universidad
Católica
de Cuenca

JEFATURA DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN

Convocatoria: Fortalecimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible

Título del proyecto

IMPLEMENTACIÓN DE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN 3
ESPECIES DE ANUROS DE LA PROVINCIA DEL AZUAY

Carrera(s): MEDICINA VETERINARIA,

Director del Proyecto:

DANIEL ARGUDO GARZÓN; 0104461165; MEDICINA VETERINARIA; UNIDAD ACADEMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS; MATRIZ

Colaboradores del Proyecto

Juan Carlos Alvarado Alvarado; 0103352811; Medicina Veterinaria; Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias; Matriz.

Código de Proyecto: PICODS21-01

Julio de 2022

Versión 4.0

TABLA DE CONTENIDOS

DATOS GENERALES DEL PROYECTO	3
1. TÍTULO	3
2. CARRERAS INVOLUCRADAS – PROGRAMAS DE POSGRADOS	3
INVESTIGADORES PARTICIPANTES EN EL PROYECTO	3
3. PERSONAL DEL PROYECTO – DIRECTOR DEL PROYECTO	3
4. PERSONAL DEL PROYECTO – COLABORADORES UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA	5
5. PERSONAL DEL PROYECTO – COLABORADORES EXTERNOS.....	6
ESTUDIANTES PARTICIPANTES EN EL PROYECTO.....	7
6. PERSONAL DEL PROYECTO – ESTUDIANTES	7
CENTRO DE INVESTIGACIÓN INVOLUCRADOS Y BENEFICIARIOS.....	7
7. LABORATORIO DEL CIITT(CENTRO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA) QUE SE ANCLA EL PROYECTO	7
8. LÍNEA DE INVESTIGACIÓN INSTITUCIONAL	8
9. SUB LÍNEA DE INVESTIGACIÓN INSTITUCIONAL	8
10. CAMPO, DISCIPLINA Y SUBDISCIPLINA UNESCO	8
11. PROGRAMA:.....	8
12. OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE (ODS) QUE IMPULSA EL PROYECTO.....	8
13. TIEMPO DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO.....	8
FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO.....	8
16. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO	9
DESCRIPCIÓN DE LA PROPUESTA	10
17. RESUMEN DEL PROYECTO	10
18. PALARAS CLAVES	10
19. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	10
20. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	10
21. OBJETIVOS	12
22. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
23. MARCO METODOLÓGICO	12
IMPACTO DEL PROYECTO	14
24. RESULTADOS ESPERADOS DEL PROYECTO.....	14
25. TRANSFERENCIA Y DIFUSIÓN DE RESULTADOS	14
26. REQUIERE ALGÚN AVAL ESPECIAL, PERMISO DEL COMITÉ DE BIOÉTICA O DEL MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA, DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE U OTRO.	15
27. CONSIDERACIONES ÉTICAS DE LA PROPUESTA.....	15
28. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
FIRMA DE RESPONSABILIDAD.....	18
ANEXOS	19

DATOS GENERALES DEL PROYECTO

1. TÍTULO
IMPLEMENTACIÓN DE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN 3 ESPECIES DE ANUROS DE LA PROVINCIA DEL AZUAY
2. CARRERAS INVOLUCRADAS – PROGRAMAS DE POSGRADOS
MEDICINA VETERINARIA,

INVESTIGADORES PARTICIPANTES EN EL PROYECTO

3. PERSONAL DEL PROYECTO – DIRECTOR DEL PROYECTO	
Función en el proyecto	DIRECTOR DEL PROYECTO
Nombre, Cédula; Carrera; Unidad Académica; Sede o Extensión	
DANIEL ARGUDO GARZÓN; 0104461165; MEDICINA VETERINARIA; UNIDAD ACADEMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS; MATRIZ	
3.1. Publicaciones con ISSN en los últimos 5 años de más alto nivel y cuartil de la revista:	
Título del artículo,; revista; ISSN; volumen; número; año; DOI; cuartil	
COMPARISON OF CHARACTERIZATION OF FIGHTING ROOSTER (GALLUS GALLUS) SEMEN EJACULATES RECOVERED BY ELECTROEJACULTAION AND DORSAL MASAGGE TECHNIQUES; SPERMOVA; 2223-9375; 11; 1; 2021; https://doi.org/10.18548/aspe/0009.05 ; Q4.	
Intraovarian influence of bovine corpus luteum on oocyte morphometry and developmental competence, embryo production and cryotolerance; Theriogenology; 155; 2020; https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.044 ; Q1.	
Análisis morfológico y funcional de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero y por aspiración folicular transvaginal en vacas criollas del altiplano ecuatoriano; Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú; 16099117; 31; 2; 2020; http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17838 ; Q3.	
Effect of the addition of melatonin in the oocyte maturation and/or vitrification medium on in vitro production of bovine embryos; Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú; 16099117; 31; 1; 2020; https://doi.org/10.15381/rivep.v31i1.17557 ; Q3.	

El intervalo de tiempo entre la estimulación ovárica con FSH/LH y la colecta afecta la cantidad, calidad y capacidad de desarrollo de los ovocitos recuperados de novillas criollas ecuatorianas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*; 16099117; 31; 1; 2020; <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i1.17571>; Q3.

Methods of collection, extender type, and freezability of semen collected from creole bulls raised in the tropical highlands of Ecuador; *Tropical animal health and production*; 00494747; 51; 7; 2019; <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01877-3>; Q2.

Características morfológicas y foliculares de ovarios bovinos con o sin un cuerpo lúteo; *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*; 26028220; 3; 3; 2019; Lantindex.

Uso del Azul Brillante de Cresilo en la selección de ovocitos competentes para la producción in vitro de embriones; *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*; 26028220; 3; 2; 2019; Lantindex.

Efecto del agente sexador bovino sobre la producción in vitro de embriones hembras; *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*; 26028220; 3; 3; 2019; Lantindex.

Effect of storage temperatures of bull's epididymis on frozen-thawed sperm quality; *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*; 07982259; 28; 6; 2018; Q4.

Ajuste del tiempo de inseminación con semen sexado en vacas Holstein en producción superovuladas; *Revista Electrónica de Veterinaria*; 16957504; 19; 4; 2018; Q3.

Valoración de dos protocolos de superovulación para la producción de embriones en vacas Holstein; *Revista de Producción Animal*; 22247920; 30; 2; 2018; Latindex.

Competencia del ovocito bovino obtenido por ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de cresilo; *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*; 16099117; 29; 2; 2018; <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i2.13816>; Q3.

La ozonoterapia como alternativa de tratamiento para la mastitis clínica en ganado de leche; *Maskana*; 24778893; 8; 22; 2017; Latindex.

Influencia del cuerpo lúteo activo sobre la competencia y características morfológicas de ovocitos bovinos; *Maskana*; 24778893; 8; 22; 2017; Latindex.

Efecto de la época del año sobre las características seminales de toros de fenotipo Criollo ecuatoriano; *Maskana*; 24778893; 8; 22; 2017; Latindex.

Efecto de un tranquilizante sobre las características seminales de toros colectados con electroeyaculador; *Maskana*; 24778893; 8; 22; 2017; Latindex.

Efecto de la aplicación de bST durante un tratamiento superovulatorio sobre la respuesta ovárica y la producción de embriones transferibles en vacas mestizas; *Maskana*; 24778893; 8; 22; 2017; Latindex.

Competencia del ovocito bovino obtenido por Ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de Cresilo; Maskana; 24778893; 8; 22; 2017; Latindex.

Caracterización de la fertilidad en un rebaño Holstein Neozelandés de la sierra sur del Ecuador; Maskana; 24778893; 8; 22; 2017; Latindex.

3.2. Libros y capítulos de libro en los últimos 5 años.

Título del libro o capítulo de libro; editorial; ISBN; número; año; revisión de pares (SI-NO)

3.3. Proyectos de Investigación desarrolladas en los últimos cinco años de mayor relevancia:

Nombre del proyecto; Institución; Monto financiado; fecha de inicio; fecha de culminación.

Respuesta superovulatoria y viabilidad embrionaria con la aplicación epidural de FSH-p en ovejas; Universidad Católica de Cuenca; \$19994; Marzo 2021; Activo a la presente fecha.

Rol de la hormona antimülleriana para predecir la disponibilidad de folículos en vacas, que respondan a la superovulación y generen ovocitos o embriones competentes in vivo e in vitro; Universidad de Cuenca; \$50000; Septiembre 2019; Septiembre 2020.

Producción de embriones in vitro (PIV), con ovocitos obtenidos mediante OPU de vaquillas estimuladas con protocolos alternativos; Universidad de Cuenca; \$20000; Marzo 2018; Febrero 2019.

Caracterización de biotécnicas reproductivas para conservación de gametos y embriones de bovino criollo, para establecer un banco de germoplasma; Universidad de Cuenca; \$50000; Marzo 2015; Agosto 2018.

4. PERSONAL DEL PROYECTO – COLABORADORES UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Función en el proyecto

COLABORADORES UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA
(UCACUE)

Nombre, Cédula; Carrera; Unidad Académica; Sede o Extensión

Juan Carlos Alvarado Alvarado; 0103352811; Medicina Veterinaria; Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias; Matriz.

4.1. Publicaciones con ISSN en los últimos 5 años de más alto nivel y cuartil de la revista:

Título del artículo,; revista; ISSN; volumen; número; año; DOI; cuartil

COMPARISON OF CHARACTERIZATION OF FIGHTING ROOSTER (GALLUS GALLUS) SEMEN EJACULATES RECOVERED BY ELECTROEJACULTAION AND DORSAL MASAGGE TECHNIQUES; SPERMOVA; 2223-9375; 11; 1; 2021; <https://doi.org/10.18548/aspe/0009.05>; Q4.

PAINVET: ESCALA DIGITAL DE VALORACIÓN DEL DOLOR EN PERROS; REVISTA CUMBRES; 1390-3365; 7; 1; 2021; <https://doi.org/10.48190/cumbres.v7n1a6>; LATINDEX.

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE CARDÍACO VERTEBRAL EN PERROS DE RAZA MESTIZA; REVISTA SALUD Y TECNOLOGIA VETERINARIA; 23123907; 8; 1; 2020; LATINDEX.

EFFECTO DEL SEXO, TAMAÑO DE CAMADA Y NÚMERO DE PARTO SOBRE LOS PESOS AL NACIMIENTO Y AL DESTETE DE COBAYOS (CAVIA PORCELLUS) DEL GENOTIPO CIENEGUILLA; REVISTA CIENTÍFICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA; 07982259; 29; 1; 2019; Q4.

4.2. Libros y capítulos de libro en los últimos 5 años.

Título del libro o capítulo de libro; editorial; ISBN; número; año; revisión de pares (SI-NO)

4.3. Proyectos de Investigación desarrolladas en los últimos cinco años de mayor relevancia:

Nombre del proyecto; Institución; Monto financiado; fecha de inicio; fecha de culminación.

Efecto de la Aplicación de dos dosis de Solución Nutritiva en la Producción de Forraje Verde Hidropónico como suplemento alimenticio en cuyes; Universidad Católica de Cuenca; \$16620; Marzo 2019; Activo a la presente fecha.

Respuesta superovulatoria y viabilidad embrionaria con la aplicación epidural de FSH-p en ovejas. Universidad Católica de Cuenca; \$19994; Marzo 2021; Activo a la presente fecha.

5. PERSONAL DEL PROYECTO – COLABORADORES EXTERNOS

Función en el proyecto	COLABORADORES EXTERNOS
Nombre; Institución	
Fausto Rodrigo Siavichay Pesántez; Centro de Conservación de Anfibios AMARU, Cuenca, Ecuador.	
5.1. Publicaciones con ISSN en los últimos 5 años de más alto nivel y cuartil de la revista:	
Título del artículo; revista; ISSN; volumen; número; año; DOI; cuartil	
Fausto Rodrigo Siavichay Pesántez; Red List assessment of amphibian species of Ecuador: A multidimensional approach for their conservation; PLOS ONE; 19326203; 16; 5; 2021; 10.1371/journal.pone.0251027; Q1.	
5.2. Libros y capítulos de libro en los últimos 5 años.	
Título del libro o capítulo de libro; editorial; ISBN; número; año; revisión de pares (SI-NO)	

Fausto Rodrigo Siavichay Pesántez; Manual de los Anfibios Urbanos de Cuenca; DON BOSCO; 978-9942-14-614-4; 2016; SI.

□

Fausto Rodrigo Siavichay Pesántez; Plan de Manejo para la conservación de los Anfibios Urbanos de Cuenca; MUNICIPALIDAD DE CUENCA; 2016; NO.

Fausto Rodrigo Siavichay Pesántez; Experiencia del Monitoreo Biológico de Anfibios y el Centro de Conservación de Anfibios AMARU; MINISTERIO DEL AMBIENTE Y AGUA; 2020; NO.

5.3. Proyectos de Investigación desarrolladas en los últimos cinco años de mayor relevancia:

Nombre del proyecto; Institución; Monto financiado; fecha de inicio; fecha de culminación.

Empowered Communities Saving Harlequin Toads; Disney Found a través de Re: Wild - EEUU; \$ 50.000; 2021; hasta la fecha.

Monitoreo de atelopos bomolochos en el cantón Sígsig; Zoológico de Leipzig – Alemania; \$ 7.600; 2018; 2019.

ESTUDIANTES PARTICIPANTES EN EL PROYECTO

6. PERSONAL DEL PROYECTO – ESTUDIANTES

Función en el proyecto

ESTUDIANTES COLABORADORES EN EL PROYECTO

Nombre; Cédula; Carrera; Unidad Académica; Sede o extensión; Práctica Pre profesional o Investigación Formativa.

Helen Nicole Coronel Sarmiento; 0350191862; Medicina Veterinaria; Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias; Matriz; Investigación Formativa.

Jefferson Mauricio Zhumi Cajamarca; 0150765733; Medicina Veterinaria; Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias; Matriz; Investigación Formativa.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN INVOLUCRADOS Y BENEFICIARIOS

7. LABORATORIO DEL CIITT(CENTRO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA) QUE SE ANCLA EL PROYECTO

A NINGÚN LABORATORIO

8. LÍNEA DE INVESTIGACIÓN INSTITUCIONAL

Para información sobre las líneas de investigación dirigirse al enlace [Líneas y Ámbitos de Investigación Institucionales](#).

Salud y Bienestar Animal

9. SUB LÍNEA DE INVESTIGACIÓN INSTITUCIONAL

Manejo de la fauna en el control de la salud pública y bienestar animal,

10. CAMPO, DISCIPLINA Y SUBDISCIPLINA UNESCO

Código del campo y de la disciplina según UNESCO en el enlace [SKOS](#)

10.1. Campo	24	10.2. Disciplina	1	10.3. Sub disciplina	7
--------------------	----	-------------------------	---	-----------------------------	---

11. PROGRAMA:

(En caso de que el proyecto sea parte de un programa)

12. OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE (ODS) QUE IMPULSA EL PROYECTO

15. Vida de ecosistemas terrestres,

13. TIEMPO DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO

Duración del proyecto en meses	12
--------------------------------	----

FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO

14. Monto total del financiamiento UCACUE	\$ 20.000,00
--	--------------

15. Monto total del financiamiento EXTERNO	
---	--

16. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

En todo el mundo se ha visto una drástica reducción de la diversidad de anfibios, entre las causas se encuentran la aparición de patógenos, cambio climático y el uso de su hábitat por expansión de la frontera agrícola. Por estas razones resulta indispensable tomar acciones inmediatas para evitar la desaparición de los anfibios amenazados.

En mamíferos, se han desarrollado técnicas de reproducción asistida que han permitido la multiplicación de individuos de interés productivo. No obstante, estas herramientas están siendo usadas para evitar la extinción de especies declaradas en riesgo.

Lo mencionado antes nos hacen pensar que parte de las acciones a tomar para controlar el riesgo de desaparición de anfibios son el desarrollo de biotecnologías de reproducción asistida. En anuros la información publicada sobre estas técnicas es muy escasa y la que hay es específica para ciertas especies.

En el Ecuador existen muy pocos grupos trabajando sobre el tema y específicamente en el Azuay no se está investigando por lo que consideramos necesario comenzar; para esto proponemos estandarizar técnicas de reproducción asistida propias para anuros de nuestra región. Las técnicas que ensayaremos son: 1) recuperación de espermatozoides, 2) obtención de huevos, en los dos casos mediante tratamientos hormonales comparando dos vías de administración (tópica e intraperitoneal) y 3) creación de un protocolo de fertilización in vitro. El desarrollo de éstas permitirá que sean aplicables en algunas especies en peligro inminente y por otra, reproducir de manera controlada otras que podrían estar en riesgo en un futuro.

DESCRIPCIÓN DE LA PROPUESTA

17. RESUMEN DEL PROYECTO

En todo el mundo se ha visto una drástica reducción de la diversidad de anfibios, entre las causas se encuentran la aparición de patógenos, cambio climático y el uso de su hábitat por expansión de la frontera agrícola. Por estas razones resulta indispensable tomar acciones inmediatas para evitar la desaparición de los anfibios amenazados.

En mamíferos, se han desarrollado técnicas de reproducción asistida que han permitido la multiplicación de individuos de interés productivo. No obstante, estas herramientas están siendo usadas para evitar la extinción de especies declaradas en riesgo.

Lo mencionado antes nos hacen pensar que parte de las acciones a tomar para controlar el riesgo de desaparición de anfibios son el desarrollo de biotecnologías de reproducción asistida. En anuros la información publicada sobre estas técnicas es muy escasa y la que hay es específica para ciertas especies.

En el Ecuador existen muy pocos grupos trabajando sobre el tema y específicamente en el Azuay no se está investigando por lo que consideramos necesario comenzar; para esto proponemos estandarizar técnicas de reproducción asistida propias para anuros de nuestra región. Las técnicas que ensayaremos son: 1) recuperación de espermatozoides, 2) obtención de huevos, en los dos casos mediante tratamientos hormonales comparando dos vías de administración (tópica e intraperitoneal) y 3) creación de un protocolo de fertilización in vitro. El desarrollo de éstas permitirá que sean aplicables en algunas especies en peligro inminente y por otra, reproducir de manera controlada otras que podrían estar en riesgo en un futuro.

18. PALABRAS CLAVES

Anuros, espermatozoides, ovoposición, estimulación hormonal, fecundación in vitro

19. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Como es conocido el Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad, sin embargo, en un reporte reciente publicado en mayo del 2021 [1] se registraron alrededor de 635 especies de anfibios de los cuales un 69% se encuentran en algún estado de amenaza y riesgo de extinción y la mayor parte se encuentran en el bosque andino y en el páramo ecuatoriano. Los autores de este reporte concluyen que entre las acciones a considerar son los programas de conservación y reproducción ex situ. Las técnicas de reproducción asistida en anfibios comenzaron a desarrollarse en el mundo desde hace más de dos décadas, esto dado el estado de emergencia de anfibios en peligro reportado en los años 70' y 80' [2]. En el Ecuador la información sobre la aplicación de técnicas de reproducción asistida en anfibios es limitada, por lo que resulta indispensable instaurar dichas biotécnicas debido al peligro antes mencionado. La incorporación de tecnologías de reproducción en programas de reproducción en cautiverio con el objetivo de reintroducir a las especies en peligro tiene potenciales ventajas, como; mayor propagación de las especies; sincronización de eventos reproductivos; posibilidad de obtener mayor diversidad genética ya que se puede evitar el cruzamiento de individuos emparentados; reproducción controlada, mayor oportunidad para la reproducción de genotipos particulares; y necesidad reducida de espacios para la reproducción [3].

20. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

IMPORTANCIA DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO

Las especies de anfibios *Atelopus nanay* y *Atelopus bomolochos* pertenecen al grupo más amenazados del planeta [20], sus poblaciones naturales en la provincia del Azuay están diezmaradas, debido a que se han identificado amenazas in situ como la Quitridiomycosis y la depredación por especies invasoras como la Trucha en sus hábitats naturales [21]. Por otro lado, la especie *Ctenophryne aequatorialis* es un Microhylido que se encuentra presente dentro de la ciudad de Cuenca en zonas urbanas, y su comportamiento fosorial dificulta su fácil detección.

Como una estrategia de conservación para estas especies se ha propuesto el manejo bajo cuidado humano, representando esta iniciativa como una de las pocas alternativas ante su acelerada extinción. Sin embargo, su reproducción ex situ resulta un reto para los investigadores debido a sus diferentes factores bióticos y abióticos de cual requieren en estado natural para su reproducción, y que bajo el manejo ex situ son limitadas.

TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN ANFIBIOS

Las tecnologías reproductivas tienen un potencial enorme para mejorar la propagación y el manejo genético de especies amenazadas se ha visto esto ya en mamíferos y hace poco tiempo ha tomado importancia en anfibios. Hasta el momento en varias especies se han desarrollado técnicas de estimulación hormonal para la recuperación de gametos, criopreservación espermática y fertilización in vitro [6].

RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

Actualmente, varios estudios han demostrado la eficacia de la aplicación hormonal en ranas para la recuperación de espermatozoides y huevos. La recuperación de espermatozoides se realiza mediante la inyección de hormonas y tiempo después (1 a 24 horas) se realiza la aspiración en la cloaca del extracto uro espermático. Della Togna et al. [4] compararon diferentes protocolos hormonales para la recuperación de espermatozoides del *Atelopus zeteki*, una especie de rana en peligro de

extinción endémica de Panamá. En el estudio se demostró que la combinación de GnRH-A + Metoclopramida, mezcla de drogas conocida como AmphiplexTM, inyectada por vía intraperitoneal fue la más efectiva para la recuperación de una mayor concentración de espermatozoides. Otro trabajo realizado en Australia en la rana Booroolong [5] demostró que la aplicación de 40 UI/g de hCG (gonadotropina coriónica humana) produjo espermiación en el 100% de los individuos entre 1 y 6 horas luego de la aplicación del tratamiento. Estos y otros estudios demuestran la efectividad de estas hormonas para liberar espermatozoides y recuperarlos en altas concentraciones. Por otra parte, si bien las inyecciones hormonales son efectivas, las mismas podrían comprometer el bienestar de los animales además de causar lesiones y riesgo de transmisión de enfermedades. Por esta razón se han estudiado la efectividad de otras vías de aplicación de las hormonas. Silla et al. [7] establecieron que la aplicación de 50 a 100 µg GnRH-A en la región ventral pélvica de forma tópica en ranas rosadas (*Geocrinia rosea*) produce liberación efectiva de espermatozoides en concentraciones similares a la vía subcutánea. Aunque la información citada anteriormente es promisoriosa y nos hace pensar la aplicabilidad en cualquier otra especie, hay que considerar que no en todos los anuros la estimulación hormonal funciona de la misma manera [8,9] por lo que debe ser probada y ajustada en cada especie.

RECUPERACIÓN DE HUEVOS

En los anfibios, se ha reconocido desde hace mucho tiempo que la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) tiene efectos estimulantes para inducir el desove [12] e incluso estimula el amplexus y la fertilización [13]. Así como en los machos, en las hembras también han sido ensayados protocolos con gonadotropinas para inducir la liberación de huevos. Trudeau et al. [10] demostraron la validez del método AmphiplexTM (inyección de GnRH-A + metoclopramida) en la ovoposición de cuatro especies de ranas definiéndolo como una herramienta de reproducción simple, económica y efectiva. Otro trabajo [11] realizado en *Atelopus zeteki* demostró que la aplicación de 0.05 µg/g de GnRH-A es suficiente para liberar huevos en 48 horas posteriores a la inyección. Así también, los autores manifiestan que la estimulación hormonal disminuye la tasa de mortalidad comparada con el control (sin tratamiento), definiendo la dosis adecuada y el incremento de la sobrevivencia de las hembras durante la reproducción. Como se mencionó anteriormente, aunque los tratamientos hormonales son efectivos su aplicación por vía parenteral (intraperitoneal o subcutáneo) resulta dificultosa por los problemas que podrían acarrear en la salud y bienestar de los anfibios. Por otra parte, la textura y la forma de la piel de los anfibios tiene características que le permiten absorber agua por capilaridad para redirigirla a otras partes del cuerpo, sobre todo en la región ventral y lateral [14]. Esta característica ha permitido que la zona ventral pélvica sea usada como vía de administración (tópica) de tratamientos hormonales produciendo ovoposición de manera efectiva en una dosis de 25 µg/g en ranas corrobore del norte (*Pseudophryne pengilleyi*) [15].

FERTILIZACIÓN IN VITRO

El desarrollo de los protocolos hormonales de espermiación y ovoposición en anfibios ha facilitado el desarrollo de otras técnicas de reproducción asistida como la fecundación in vitro [3]. La técnica se ha descrito en varias especies

de ranas y consiste en la inducción de la ovulación (ovoposición) de la hembra vía hormonal y posteriormente inseminación con un macerado testicular [16] usando una caja petri en los primeros estadios y luego colocados en contenedores con agua fresca y renovada cada cierto tiempo [17]. En Albania, se estandarizó la técnica de fertilización artificial en la rana de agua albanesa [18]. Los autores determinaron la importancia de la capa gelatinosa de los huevos en la fertilización, la misma tiene un efecto quimio táctico con los espermatozoides atrayéndolos, también induce cambios en la cinética espermática volviéndolos más rápidos e impide la poliespermia. En el Ecuador la técnica de fertilización artificial ha sido descrita únicamente en el sapo de caña (*Rhinella marina*) utilizando semen congelado [19]. No obstante, en otros anfibios en nuestra búsqueda no se encontró ninguna publicación por lo que consideramos necesario implementar programas y técnicas de reproducción asistida en los anfibios ecuatorianos y particularmente en los del Azuay.

21. OBJETIVOS

Estandarizar técnicas de reproducción asistida para la conservación ex situ de 3 especies de anuros de la provincia del Azuay.

22. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de la estimulación hormonal por dos vías de aplicación (intraperitoneal y tópica) y el tiempo de extracción sobre los parámetros espermáticos en *Ctenophryne aequatorialis*, *Atelopus nanay* y *Atelopus bomolochos*.
2. Comparar dos vías de administración (intraperitoneal y tópica) de la hormona estimulante en la ovoposición de *Ctenophryne aequatorialis*, *Atelopus nanay* y *Atelopus bomolochos*.
3. Establecer principios para la fertilización in vitro en 3 especies de anfibios del Azuay.

23. MARCO METODOLÓGICO

Animales e Instalaciones. - Los animales y las instalaciones donde estos estarán alojados serán provistos por el Centro de conservación de anfibios CCA-AMARU.

Condiciones Técnicas del Manejo de los anfibios:

1.- Cuarentena

Los anfibios una vez ingresados a las instalaciones del Centro de Conservación de Anfibios AMARU, entran en un periodo de cuarentena, donde el personal veterinario realiza exámenes de rutina observando movimientos y estímulos propios de las diferentes especies, determinando que todos los individuos se encuentren saludables físicamente. Adicional al chequeo se realizan exámenes coprológicos, cuyos resultados están disponibles en una ficha médica de control; este examen es indispensable para determinar la carga parasitaria que poseen los individuos.

2.- Contención Física

Los anfibios son manipulados con guantes desechables de látex o nitrilo por parte del personal técnico, la sujeción del animal es de una manera en la que se encuentre seguro y no le ocasione algún problema físico. Luego de la manipulación, se desechan los guantes en contenedores de material contaminado.

Las condiciones de enriquecimiento de los recintos son muy importantes para el bienestar de los anfibios, debido a que eso invitará que los animales se alteren o depriman, provocando posteriores problemas en su comportamiento y reproducción. Al igual que las condiciones ambientales de luz y agua. Los parámetros evaluados constantemente son; pH, Nitritos, Amoniaco, Temperatura y Oxigenación.

3.- Nutrición y alimentación

La alimentación de las especies a ser reproducidas es muy rigurosa, debido a que esta es la primera condición para el desarrollo de los huevos en las hembras, en el CCA AMARU está basado en un equilibrio entre diferentes insectos e invertebrados como la grillos, moscas de la fruta, larvas de polillas entre otros, todos criados bajo normas de bioseguridad en los laboratorios de bioterios, la frecuencia con que se les alimenta a los anfibios es de tres veces por semana, según sus hábitos alimenticios de cada especie.

Equipamiento. - Todos los equipos necesarios serán provistos por la Universidad Católica de Cuenca.

A continuación, detallamos la metodología que será empleada en función de cada objetivo específico:

1.- Determinar el efecto de la estimulación hormonal por dos vías de aplicación (intraperitoneal y tópica) y el tiempo de extracción sobre los parámetros espermáticos en *Ctenophryne aequatorialis*, *Atelopus nanay* y *Atelopus bomolochos*.

Para el cumplimiento de este objetivo se compararán dos vías de aplicación hormonal intraperitoneal y tópica con al menos 4 machos (debido a la baja disponibilidad de las especies y de ser posible se incluirán mas animales) en cada una de las vías y de cada especie. Posteriormente, se harán colectas espermáticas, las mismas serán realizadas a las 0.5, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 horas post aplicación del tratamiento hormonal.

Los datos que se registrarán son:

-Volumen: será medido con la ayuda de una micropipeta y se expresará en microlitros.

-Concentración: con la ayuda de una cámara de Neubauer y un microscopio se realizará un conteo espermático y se expresará en millones / mL.

-Azoospermia: Con un microscopio se observará la muestra obtenida y se registrará la cantidad de muestras azoospermicas, el resultado se expresará en porcentaje.

-Motilidad individual progresiva: De manera subjetiva con la ayuda de un microscopio de contraste de fases se realizará una evaluación de la motilidad progresiva de los espermatozoides y se le asignará un porcentaje.

-Anormalidades y Vitalidad: Se realizará una mezcla de espermatozoides con una coloración supra vital de eosina-nigrosina y con un extendido de esta mezcla se procederá a realizar una evaluación de la cantidad de espermatozoides, vivos, muertos y anormales sus resultados serán expresados en porcentaje.

-Integridad de membrana plasmática: Una muestra espermática será sometida el fluorocromo yoduro de propidio para determinar la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides para esto se utilizará un microscopio de fluorescencia.

2.- Comparar dos vías de administración (intraperitoneal y tópica) de la hormona estimulante en la ovoposición de *Ctenophryne aequatorialis*, *Atelopus nanay* y *Atelopus bomolochos*.

Así como en los machos, en las hembras de cada especie también será evaluada la vía de administración de la hormona inductora de la ovoposición (intraperitoneal y tópica).

Al menos en 4 hembras de cada especie y por cada vía de aplicación (debido a la baja disponibilidad de las especies; de ser posible se incluirán mas animales) se evaluará:

-Tiempo de ovoposición: Para esto se realizará observaciones en cada hembra a las 12, 24, 36, 48 Y 72 h luego de la aplicación de los tratamientos y se determinará a qué momento se realiza la ovoposición.

-Cantidad huevos y peso de huevos: Se registrará la masa de huevos expresada en gramos y la cantidad de huevos de cada hembra con cada tratamiento y de cada especie.

3.- Establecer principios para la fertilización in vitro en 3 especies de anuros del Azuay Una vez establecidas las mejores condiciones de extracción de espermatozoides y de huevos se procederá en cada una de las especies a realizar una fertilización in vitro.

Se comparará entre las especies la eficiencia de la fertilización in vitro. Se tomarán huevos de las hembras y serán puestos en contacto directo con los espermatozoides previamente activados en cajas petri y luego de fertilizados pasados a contenedores plásticos con agua reposada para el desarrollo embrionario.

Los datos a registrar serán:

-Fertilización: Se obtendrá el porcentaje de huevos fertilizados comparando la cantidad de huevos clivados (divididos) con respecto a los puestos en cultivo.

-Desarrollo embrionario: Asimismo, después de la fertilización se registrará la cantidad de embriones que avanzaron en su desarrollo con los huevos puesto en cultivo inicialmente. Este resultado será expresado en porcentaje.

-Metamorfosis: Se cuantificarán el número de animales desarrollados según la Tabla de Gosner con respecto al número de huevos fertilizados y su resultado será expresado en porcentaje.

IMPACTO DEL PROYECTO

24. RESULTADOS ESPERADOS DEL PROYECTO

Un factor preponderante para la elaboración de esta investigación es la falta de conocimiento sobre las principales biotecnologías en la reproducción de anfibios en el sector sur del país, por lo cual se pretende promover esta práctica e incentivar a los profesionales a establecer estas biotecnologías.

El gran impacto que generara sin lugar a duda es que la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Cuenca, aborde temas que ayude a dar solución a problemas de la sociedad y a profesionales que son los que más requieren de estas alternativas para mejorar su experticia y llegar a conservar especies en peligro de extinción, ya que la Universidad dispondrá de bancos zoo genéticos a disposición cuando se requiera.

Otro impacto de relevancia de la presente investigación constituye la disponibilidad de equipamiento que contribuirá en el proceso de enseñanza aprendizaje de nuestros estudiantes y de la comunidad interesada en incorporar este tipo biotecnología.

Con la creación de un banco zoo-genético podremos almacenar espermatozoides por un periodo de tiempo indeterminado, constituyéndonos en la Primera Institución Educativa en contar con este recurso en el austro ecuatoriano.

Se pretende al término de la investigación, realizar la publicación en alguna revista científica a nivel Nacional o Internacional, con la finalidad de que los resultados sirvan como base para crear nuevas investigaciones.

25. TRANSFERENCIA Y DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Al término de la investigación, los resultados obtenidos serán puestos a consideración de las Autoridades de la Universidad para que sean analizados previamente con el fin de salvaguardar los derechos de propiedad intelectual, los resultados serán publicados en una revista científica de alto impacto.

El presente proyecto también contribuye con un avance tecnológico, el mismo que culminado va a ser socializado con estudiantes y profesionales locales mediante cursos o seminarios.

Se pondrá a disposición de entidades gubernamentales locales con los cuales existen convenios para mediante ellos crear programas de Vinculación con la Sociedad y así poner a disposición el uso de estas biotecnologías reproductivas.

- Generación de nuevas investigaciones en temas relacionados.
- Desarrollar nuevas Biotecnologías específicas para los anuros de nuestra zona.
- Formación Académica de alumnos de pre y posgrado de la Unidad Académica.
- El equipamiento adquirido servirá en lo posterior para realizar cursos, seminarios, tesis de graduación y otros proyectos de investigación.

26. REQUIERE ALGÚN AVAL ESPECIAL, PERMISO DEL COMITÉ DE BIOÉTICA O DEL MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA, DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE U OTRO.

NO

Justificación: No se requiere obtener permisos ya que existe un convenio Marco de cooperación entre la Universidad Católica de Cuenca y la fundación AMARU firmado en agosto del 2021 y AMARU ya cuenta con las patentes de funcionamiento para el manejo de fauna silvestre otorgada por el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica.

27. CONSIDERACIONES ÉTICAS DE LA PROPUESTA

En animales en cautiverio el estudio de su comportamiento nos permite identificar qué procesos de manejo pueden resultar más ventajosos desde el punto de vista productivo y hasta qué punto puede ser beneficioso tanto para el animal como para el hombre un cambio en dichos procesos. Para manejar correctamente los animales, son necesarios los conocimientos sobre el comportamiento de los mismos; esta información permite también capacitar al personal, ya que se aprende más fácil cuando se puede fundamentar el porqué de las cosas de una u otra forma. La misma información del comportamiento animal ha sido relevante para fundamentar el diseño más apropiado de las estructuras en las que se alojan y se manejan los animales.

En consecuencia, en la presente investigación, se procederá a generar una estrategia de biotecnología reproductiva, con el fin de conservar las cualidades genéticas, las mismas que se pueden perennizar en con miras de conservación y de transferencia de tecnología, sin embargo cabe mencionar que todos las técnicas utilizadas en estos

protocolos son confiables, dado que las mismas se vienen ejecutando de manera continua sin producir ningún tipo de daño ni físico, ni fisiológico, permitiendo que el animal en un periodo determinado de tiempo recupere su estado reproductivo natural.

28. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ortega-Andrade HM, Rodes Blanco M, Cisneros-Heredia DF, Guerra Arévalo N, López de Vargas-Machuca KG, Sánchez-Nivicela JC, et al. Red List assessment of amphibian species of Ecuador: A multidimensional approach for their conservation. PLoS One [Internet]. 2021;16(5):e0251027. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0251027>

2. Clulow J, Upton R, Trudeau VL, Clulow S. Amphibian assisted reproductive technologies: Moving from technology to application. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2019;1200:413–63. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-23633-5_14
3. Silla AJ, Byrne PG. The role of reproductive technologies in amphibian conservation breeding programs. *Annu Rev Anim Biosci* [Internet]. 2019;7(1):499–519. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115056>
4. Della Togna G, Trudeau VL, Gratwicke B, Evans M, Augustine L, Chia H, et al. Effects of hormonal stimulation on the concentration and quality of excreted spermatozoa in the critically endangered Panamanian golden frog (*Atelopus zeteki*). *Theriogenology* [Internet]. 2017;91:27–35. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.033>
5. Silla AJ, McFadden MS, Byrne PG. Hormone-induced sperm-release in the critically endangered Booroolong frog (*Litoria booroolongensis*): effects of gonadotropin-releasing hormone and human chorionic gonadotropin. *Conserv Physiol* [Internet]. 2019;7(1):coy080. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/conphys/coy080>
6. Silla AJ, Calatayud NE, Trudeau VL. Amphibian reproductive technologies: approaches and welfare considerations. *Conserv Physiol* [Internet]. 2021;9(1):coab011. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/conphys/coab011>
7. Silla AJ, Roberts JD, Byrne PG. The effect of injection and topical application of hCG and GnRH agonist to induce sperm-release in the roseate frog, *Geocrinia rosea*. *Conserv Physiol* [Internet]. 2020;8(1):coaa104. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/conphys/coaa104>
8. Germano JM, Cree A, Molinia F, Arregui L, Bishop PJ. Hormone treatment does not reliably induce spermiation or mating in Hamilton’s frog from the archaic leiopelmatid lineage. *Reprod Fertil Dev* [Internet]. 2021;34(5):447–52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1071/rd21061>
9. Watt AM, Marcec-Greaves R, Pitcher TE. Time from injection of luteinizing hormone-releasing hormone analog affects sperm quality in the critically endangered Mississippi gopher frog (*Lithobates sevosus*). *Zoo Biol* [Internet]. 2020;39(1):23–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/zoo.21519>
10. Trudeau VL, Somoza GM, Natale GS, Pauli B, Wignall J, Jackman P, et al. Hormonal induction of spawning in 4 species of frogs by coinjection with a gonadotropin-releasing hormone agonist and a dopamine antagonist. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2010;8(1):36. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-8-36>
11. Bronson E, Guy EL, Murphy KJ, Barrett K, Kouba AJ, Poole V, et al. Influence of oviposition-inducing hormone on spawning and mortality in the endangered Panamanian golden frog (*Atelopus zeteki*). *BMC Zool* [Internet]. 2021;6(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s40850-021-00076-8>
12. Vu M, Trudeau VL. Neuroendocrine control of spawning in amphibians and its practical applications. *Gen Comp Endocrinol* [Internet]. 2016;234:28–39. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.03.024>

13. Vu M, Weiler B, Trudeau VL. Time- and dose-related effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist and dopamine antagonist on reproduction in the Northern leopard frog (*Lithobates pipiens*). *Gen Comp Endocrinol* [Internet]. 2017;254:86–96. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.09.023>
14. Toledo RC, Jared C. Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* [Internet]. 1993;105(4):593–608. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90259-7](http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629(93)90259-7)
15. Silla AJ, McFadden M, Byrne PG. Hormone-induced spawning of the critically endangered northern corroboree frog *Pseudophryne pengilleyi*. *Reprod Fertil Dev* [Internet]. 2018;30(10):1352–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1071/RD18011>
16. Silla AJ, Byrne PG. Hormone-induced ovulation and artificial fertilisation in four terrestrial-breeding anurans. *Reprod Fertil Dev* [Internet]. 2021;33(9):615. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1071/rd20243>
17. Turani, B, Aliko, V. Development of assisted reproduction technologies for the endangered Albanian water frog (*Pelophylax shqipericus*): From gamete release to froglets. In *Science Conference*. 2018:152.
18. Turani B, Aliko V, Faggio C. Allurin and egg jelly coat impact on in-vitro fertilization success of endangered Albanian water frog, *Pelophylax shqipericus*. *Nat Prod Res* [Internet]. 2020;34(6):830–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2018.1508147>
19. Proaño B, Pérez OD. In vitro fertilizations with cryopreserved sperm of *Rhinella marina* (Anura: Bufonidae) in Ecuador [Internet]. *Amphibian-reptile-conservation.org*. 2017 [citado 22 de marzo de 2022]. Disponible en: [http://amphibian-reptile-conservation.org/pdfs/Volume/Vol_11_no_2/ARC_11_2_\[Special_Section\]_1-6_e143_high_res.pdf](http://amphibian-reptile-conservation.org/pdfs/Volume/Vol_11_no_2/ARC_11_2_[Special_Section]_1-6_e143_high_res.pdf)
20. Valencia LM, Marin LF, Barros J, Della Togna G, Gratwicke B, Guayasamin JM, et al. *Iucn-amphibians.org*. [citado 22 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://www.iucn-amphibians.org/wp-content/uploads/2021/08/HarleCAP-2021-Espanol.pdf>
21. Siavichay F. Diagnóstico de la Comunidad de Anfibios para el Manejo y Gestión del Área de Conservación Municipal y Uso Sustentable Cordillera Oriental del cantón Sigsig. [Cuenca]: Universidad del Azuay; 2018.

FIRMA DE RESPONSABILIDAD



**DIRECTOR DEL PROYECTO: PICODS21-01
DANIEL ARGUDO GARZÓN; 0104461165;
MEDICINA VETERINARIA; UNIDAD
ACADEMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS;
MATRIZ**



**Ing. Javier Cabrera Mejía, PhD.
JEFE DE INVESTIGACIÓN E
INNOVACIÓN**

ANEXOS

Planilla de anexos del Proyecto

[{"title":"Anexos Proyecto anfibios","comment":"","size":"93.933","name":"Anexos%20Proyectos_anfibios.xlsx","filename":"fu_eunabhj4yb9dea5","ext":"xlsx" }]
Número de Archivos: **1**

Documento de contraparte firmado (Solo en caso de financiamiento externo)

Número de archivos:

Documentación adicional

[{"title":"Convenio Marco Ucacue-AMARU","comment":"","size":"618.316","name":"CONVENIO%20UNIVERSIDAD%20CATOLICA%20AMARU%20listofirmado.pdf","filename":"fu_q35brmab4vc9jc9","ext":"pdf" }]

Número de archivos: **1**

Fecha de la versión generada: 2022-03-22 17:48:51