



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS VERACRUZ**

POSTGRADO EN AGROECOSISTEMAS TROPICALES

**DESARROLLO *in vitro* DE EMBRIONES DE LA RAZA LECHERO TROPICAL  
OBTENIDOS *in vivo* CRIOPRESERVADOS POR VITRIFICACIÓN O CONGELACIÓN  
LENTA**

LUIS MOISÉS MORALES CRISPÍN

**TESIS**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

TEPETATES, MANLIO FABIO ALTAMIRANO, VERACRUZ, MÉXICO.

2016

La presente tesis titulada: **Desarrollo *in vitro* de embriones de la raza Lechero Tropical obtenidos *in vivo* criopreservados por vitrificación o congelación lenta**, realizada por el alumno: **Luis Moisés Morales Crispín**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
AGROECOSISTEMAS TROPICALES

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



---

DR. ADALBERTO ROSENDO PONCE

ASESOR:



---

DR. OCTAVIO RUÍZ ROSADO

ASESOR:



---

DR. CARLOS MIGUEL BECERRIL PÉREZ

ASESOR:



---

DR. RODOLFO CANSECO SEDANO

ASESOR:



---

DR. JOSÉ ANTONIO MARTÍNEZ GARCÍA

Tepetates, Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, México, 09 de Mayo de 2016.

**DESARROLLO *in vitro* DE EMBRIONES DE LA RAZA LECHERO TROPICAL  
OBTENIDOS *in vivo* CRIOPRESERVADOS POR VITRIFICACIÓN O CONGELACIÓN  
LENTA**

**Luis Moisés Morales Crispín, M. C.**

**Colegio de Postgraduados, 2016**

**RESUMEN**

La criopreservación es una alternativa útil para la conservación de germoplasma de ganado Lechero Tropical, al utilizar reproductores genéticamente superiores, programar cruzamientos y planificar la estructuración de la raza. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el desarrollo *in vitro* de embriones de la raza Lechero Tropical criopreservados por vitrificación (Vt) o congelación lenta (Cl). Se utilizaron 16 vacas donadoras experimentales, ocho Lechero Tropical (LT) puras y ocho mestizas LT x Tarentaise (TA). Se les indujo la estimulación ovárica empleando dos protocolos de superovulación, la respuesta permitió comparar el NCL, ONF, ED, MOR, BLA, ET Y TER. No se encontraron diferencias significativas ni efectos principales entre protocolos y genotipos, ni de interacción. Del número de ET, se criopreservaron por Cl (21 LT y 17 TA; n=38) y por Vt (17 LT y 16 TA; n=33). La tasa de eclosión embrionaria para Vt fue del 60.61% (20/33 embriones) y 36.84% (14/38 embriones) para Cl. Los embriones TA presentaron una mayor tasa de desarrollo *in vitro* que los embriones de donadoras LT ( $6.36 \pm 0.27$  TA y  $4.00 \pm 0.43$  LT,  $P < 0.05$ ), demostrando una mayor criotolerancia a los métodos de criopreservación utilizados.

**Palabras clave:** Biodiversidad, conservación, criobanco, criollo, población.

***In vitro* DEVELOPMENT OF EMBRYOS FROM LECHERO TROPICAL DAIRY COWS  
OBTAINED *in vivo* AND CRYOPRESERVED USING VITRIFICATION OR SLOW  
FREEZING**

**Luis Moisés Morales Crispín, M. C.**

**Colegio de Postgraduados, 2016**

**ABSTRACT**

Cryopreservation is a useful method of conserving germplasm from Lechero Tropical dairy cattle, to use genetically superior breeding, crossbreeding program and plan structuring race. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* development of embryos from the race Lechero Tropical that were cryopreserved using vitrification (Vt) or slow freezing (CL). We used 16 experimental donor cows, eight pure Lechero Tropical (LT) cows, and eight crossbred LT x Tarentaise (TA) cows. We induced ovarian stimulation using two superovulation protocols, and then compared the responses in NCL, ONF, ED, MOR, BLA, ET AND TER. No significant differences or main effects were found among genotypes and protocols, nor was significant interaction observed. The number of ET, and those cryopreserved were CL (21 LT and 17 TA; n = 38) and Vt (17 LT and 16 TA; n = 33). The level of successful embryo development for Vt was 60.61% (20/33 embryos), and for CL was 36.84% (14/38 embryos). TA embryos had a higher rate of *in vitro* development than embryos from LT donors (TA =  $6.36 \pm 0.27$ , LT =  $4.00 \pm 0.43$ ;  $P < 0.05$ ), demonstrating greater tolerance to the cryopreservation methods used.

**Key words:** Biodiversity, conservation, cryobank, criollo, population.

## AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados Campus Veracruz por aceptar mi ingreso al programa de Maestría en Agroecosistemas Tropicales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por apoyar mis estudios de maestría y otorgarme el financiamiento para mi trabajo.

Al Dr. Adalberto Rosendo Ponce, por su apoyo como profesor consejero.

Al Dr. Octavio Ruiz Rosado, por guiarme a lo largo de mi formación en el área de Agroecosistemas Tropicales.

Al Dr. Carlos Miguel Becerril Pérez, por su asesoría y sus consejos el desafío de retos cada día.

Al Dr. Rodolfo Canseco Sedano, por su amistad y apoyo incomparable durante mi formación como Maestro en Ciencias y sus consejos en el área de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Dr. José Antonio Martínez García, por su amistad e incondicional apoyo desde mi formación como Médico Veterinario Zootecnista y por sus sabios consejos para mi preparación como Maestro en Ciencias.

Al Dr. Oscar Zarate Guevara por su valiosa colaboración en el trabajo de campo y de laboratorio.

## DEDICATORIA

A mi pequeño angelito, te amaremos siempre.

A mi esposa Nury Karina, por su amor incondicional y por estar a mi lado en todo momento.

A Mis padres Moisés Morales Cortes y Juana Crispín Bustos, por ser el pilar más importante de mi vida, por los valores que me han inculcado como persona, por su esmero constante y principalmente por su amor que me demuestran en todo momento, siempre están a mi lado.

A mis hermanos Julio Cesar y Juan Daniel, por los momentos amargos y también por todos los momentos más felices que hemos pasado juntos.

A mis amigos y compañeros de generación, quienes hicieron de esta una experiencia inolvidable.

Gracias a Dios, por la oportunidad que me brinda día a día.

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
<b>2.1. El agroecosistema ganadero</b> .....	4
<b>2.2. La raza Lechero Tropical en el agroecosistema ganadero</b> .....	6
2.2.1. Factores sociales .....	8
2.2.2. Factores técnico-productivos .....	9
2.2.3. Factores agroecológicos .....	11
<b>2.3. Conservación de la biodiversidad</b> .....	13
<b>2.4. Conservación por criopreservación</b> .....	15
2.4.1. Principios básicos en criobiología .....	18
2.4.2. Agentes crioprotectores .....	19
2.4.3. Efecto Crioprotector .....	20
<b>2.5. Características de embriones producidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i></b> .....	22
<b>2.6. Métodos de criopreservación de embriones</b> .....	24
2.6.1. Criopreservación por congelación lenta .....	25
2.6.2. Criopreservación por vitrificación .....	27
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	28
3.1. Objetivo general .....	28
3.2. Objetivos específicos .....	29
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	29

4.1 Hipótesis general.....	29
4.2 Hipótesis específicas.....	29
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
5.2. Producción de embriones <i>in vivo</i> .....	31
5.3. Colecta de embriones .....	32
5.4. Superovulación - Variables respuesta.....	34
5.4. Tratamientos .....	34
5.5. Criopreservación .....	34
5.6. Criopreservación por congelación lenta .....	35
5.7. Criopreservación por vitrificación .....	36
5.8. Descongelado y cultivo <i>in vitro</i> .....	36
5.9. Análisis estadístico.....	37
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
<b>6.1 Obtención de embriones <i>in vivo</i>.....</b>	<b>39</b>
6.1.1. Número de Cuerpos Lúteos .....	40
6.1.2. Ovocitos No Fertilizados (ONF).....	41
6.1.3. Embriones Degenerados (ED) .....	42
6.1.4. Mórulas (MOR).....	43
6.1.5. Blastocistos (BLA) .....	43
6.1.6. Embriones Transferibles (ET).....	44
6.1.7. Total de Estructuras Recolectadas (TER) .....	44
<b>6.2. Criopreservación y desarrollo embrionario .....</b>	<b>45</b>
6.2.1. Efecto del método de criopreservación .....	47



6.2.2. Método de criopreservación por componente racial.....	49
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>51</b>
<b>8. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>51</b>
<b>9. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pagina</b>
Figura 1. Factores sociales, técnico-productivos y ecológicos que interactúan en el agroecosistema ganadero con bovinos Lechero Tropical. ....	7
Figura 2. Protocolo de superovulación de vacas donadoras para la obtención de embriones.....	33

## LISTA DE CUADROS

	<b>Pagina</b>
Cuadro 1. Respuesta a la superovulación de vacas Lechero Tropical (LT). .....	39
Cuadro 2. Desarrollo <i>in vitro</i> de embriones de vacas Lechero Tropical (LT).....	46

## 1. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad se refiere a la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas. Actualmente, un nuevo enfoque sobre la producción eficiente y la conservación de los recursos zoogenéticos es crucial, no solo para la economía mundial, sino también para el medio ambiente (Sawicka *et al.*, 2011). La conservación de recursos zoogenéticos generalmente se realiza en poblaciones pequeñas, las cuales tienen un tamaño poblacional efectivo muy reducido. En estos casos es importante realizar apareamientos que mantengan la variabilidad genética alta y los niveles de consanguinidad bajos mediante la realización de apareamientos específicos entre los animales (Pereira *et al.*, 2012).

Los esfuerzos por conservar los recursos genéticos se enfocan en utilizar métodos *in situ*, sin embargo, se sabe que estos tienen que ser apoyados por una estrategia *ex situ* como lo es la criopreservación. Esto se refiere al almacenamiento de material genético criopreservado en nitrógeno líquido (Sawicka *et al.*, 2011). Por tal razón, las investigaciones en la ganadería bovina han dirigido su desarrollo hacia la criopreservación de oocitos y embriones obtenidos de vacas superovuladas, los cuales necesitan de la evaluación de diferentes metodologías para lograr una supervivencia aceptable (Vajta y Kuwayama, 2006). Estos métodos permiten un mejor manejo de las razas de ganado, brindando avances en cuanto a selección genética a la par de que contribuyen a la conservación de la biodiversidad (Woods *et al.*, 2004). La criopreservación de embriones puede ser empleada para elegir los reproductores,

programar los cruzamientos y planificar la estructuración de la población, con el fin de conservar la mayor proporción de la diversidad genética a lo largo del tiempo (Pereira *et al.*, 2012).

La criopreservación es el uso de temperaturas ultra-bajas (-196°C) para preservar células vivas intactas, tejidos, gametos, oocitos, muestras de ácido desoxirribonucleico (ADN), entre otros, con el fin de conservar su integridad estructural y mantener su viabilidad fisiológica a largo plazo, almacenándolas en un banco genético para uso futuro (Akhoondi *et al.*, 2011; Sharma y Sharma, 2013; Do *et al.*, 2014). Se fundamenta en la suspensión de la actividad biológica celular a bajas temperaturas que permite un almacenamiento prolongado, en teoría ilimitado, y un retorno a la viabilidad después del descongelado (Dessolle *et al.*, 2009).

Aun con los actuales avances, la conservación de las células germinales o embriones criopreservados presenta varios problemas, de los cuales los dos principales son: la formación de cristales de hielo y el riesgo de choque osmótico que puede ser inducido por el flujo de agua que se produce a través de las membranas celulares (Camus *et al.*, 2006). Aunque las técnicas de criopreservación no son técnicas consensuales (Courbière *et al.*, 2009), tradicionalmente han sido utilizadas la congelación lenta y la vitrificación (Papadopoulos *et al.*, 2002), estas técnicas han sido desarrolladas partiendo de enfoques básicos empleados en criobiología (Woods *et al.*, 2004).

La tasa de equilibrio de congelación lenta, enfriamiento lento o congelación tradicional, ha sido utilizada en la transferencia de embriones comerciales (Vajta, 2000). En la congelación lenta, los embriones son gradualmente pre-equilibrados en una solución

crioprotectora (CP) y después se enfrían a una “temperatura de siembra” (seeding). Los embriones se enfrían lentamente (menos de 1°C / min), aumentando la concentración de la solución extracelular causando la deshidratación celular. Después de que las células están lo suficientemente deshidratadas, la concentración intracelular es lo suficientemente alta para evitar la cristalización del hielo deletéreo, posteriormente, las células se sumergen y se almacenan en nitrógeno líquido (Woods *et al.*, 2004).

La vitrificación en la actualidad se está expandiendo en la biología de la reproducción (Courbière *et al.*, 2009). La vitrificación es un proceso físico que permite la criopreservación sin formación de cristales de hielo, mediante la transformación de una solución altamente concentrada en un estado vítreo o amorfo. El fenómeno puede ser considerado como un aumento extremo de la viscosidad y requiere, ya sea velocidades de enfriamiento rápido o el uso de variadas concentraciones de soluciones crioprotectoras (Vajta, 2000; Courbière *et al.*, 2009). El posible papel de la vitrificación en la embriología de los animales domésticos, es ofrecer soluciones para las áreas especiales donde los métodos como la congelación lenta han fracasado en producir resultados satisfactorios (Vajta, 2000). Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo es evaluar el desarrollo *in vitro* de embriones Lechero Tropical obtenidos *in vivo* criopreservados por vitrificación o congelación lenta.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. El agroecosistema ganadero

La palabra agroecosistema es una palabra compuesta que tiene su raíz etimológica en Agro del latín *Ager* o *Agri* que significa campo, tierra, suelo como fuente de producción; y ecosistema, concepto introducido en 1935 por Tansley, definido como “la distribución de las especies y su ensamblaje en cual es fuertemente influenciado por el ambiente asociado” (Martínez *et al.*, 2011). El agroecosistema tiene sus bases en el enfoque de sistemas y la teoría general de sistemas propuesta por Von Bertalanfy en 1976, aborda el problema de la complejidad a través de una forma de pensamiento basada en la totalidad y sus propiedades (García *et al.*, 2010; Vilaboa, 2013). El enfoque de sistemas o enfoque sistémico emplea una visión integradora (holismo) considerando la contribución de diferentes disciplinas: la teoría de la información, la cibernética y la teoría general de sistemas. Sin embargo, dicho enfoque no es considerado una ciencia ni una teoría o disciplina, sino una nueva metodología que permite la colección, la organización y la acumulación del conocimiento con el fin de incrementar la eficiencia de nuestras acciones (Conde, 2014). En contexto, Saravia (1985) menciona que el enfoque de sistemas considera todos los eventos o elementos como partes de un todo mayor y que estos están interrelacionados para cumplir una función.

La teoría general de sistemas (TGS) se fundamenta en la investigación de totalidades organizadas de muchas variables, es decir, permite abordar los problemas en términos de totalidad y no de manera lineal, ya que considera que los sistemas no son objetos de

percepción u observación directa, si no construcciones conceptuales (Pérez y Razz, 2009). La TGS constituyó un cambio radical en la visión y el análisis de la realidad. Hasta su aparición, cualquier fenómeno era estudiado aplicando principios de reduccionismo, esto es, su análisis y desglose en las partes más elementales, de modo que al ir profundizando en el estudio de los fenómenos se asiste a un proceso de especialización, con la consiguiente pérdida de visión de conjunto, y el alejamiento del problema real inicial. Frente a tal actitud reduccionista, la teoría sistémica aporta un enfoque expansionista según el cual todos los objetos y acontecimientos son parte de otros mayores. Por tanto, como un sistema es más que la suma de sus componentes, no bastaría con estudiar cada uno de éstos de manera individualizada y agregarlos después, sino que sería más lógico llevar a cabo un trabajo multidisciplinario (Ruiz y Oregui, 2001).

El enfoque y concepto de agroecosistema se utiliza en relación a su perspectiva de acción y objeto de estudio (Vilaboa *et al.*, 2009). De forma general, los agroecosistemas son ecosistemas en los que el ser humano ha ejercido una intencionada selectividad sobre la composición de los organismos vivos. Los agroecosistemas contienen poblaciones humanas y dimensiones tanto económicas como ecológico-ambientales y se diferencian de los ecosistemas no gestionados en que están alterados intencionadamente, y a menudo manejados intensivamente, con el fin de proporcionar alimentos, fibra y otros productos (FAO, 2015).

Hart (1985) menciona que el agroecosistema es un conjunto de poblaciones de plantas, animales y microorganismos, que puede incluir poblaciones de cultivos, animales domésticos o ambos, en interacción con el medio ambiente, procesando entradas de energía y materiales que producen salidas, presenta estructura, componentes, límites,



función e interacción entre componentes, entradas (inputs) y salidas (outputs) y una retroalimentación; todo esto funcionando en un proceso sinérgico para lograr un objetivo definido. Por otro lado, Vilaboa *et al.* (2009) conceptualizan al agroecosistema como modelo abstracto y objeto de estudio, que permite representar la unidad de estudio para explicar la realidad; en este sentido, puede ser aplicado en la ganadería para estudiar y conocer, de manera holística e integral, los factores agroecológicos, técnico-productivos y socioeconómicos relacionados con ésta.

Por lo tanto, en un agroecosistema ganadero, el hombre (ganadero) se relaciona como especie con el ecosistema que modifica, y con los factores abióticos y bióticos que influyen en éste; sin embargo, como individuo ejerce relaciones sociales al desarrollar los procesos productivos que le permiten obtener alimentos. El ganadero, como ente controlador, es quien determina el tipo y cantidad de entradas (inputs), administra el sistema de producción y determina la cantidad de salidas (outputs). Asimismo, éste puede establecer dentro del mismo agroecosistema otros sistemas de producción ya sea agrícola (por ejemplo, caña de azúcar) o pecuaria (ovinos) que se relacionan con el ganado bovino, además de poder realizar actividades extra-granja que permitan la inyección o extracción de dinero del sistema de producción para desarrollar otras actividades no relacionadas con el sector agrícola o viceversa (Vilaboa, 2013).

## **2.2. La raza Lechero Tropical en el agroecosistema ganadero**

Desde el punto de vista histórico, el ganado ha cumplido funciones importantes en la dinámica de los agroecosistemas: utilizan el forraje como principal fuente de alimento

incluso en áreas no aptas para la agricultura, aprovechan los subproductos agrícolas y aportan alimentos para la familia, fuerza de tracción en las labores agrícolas, así como materias primas para las actividades artesanales, recolectan y concentran los minerales que sirven de abono a los cultivos y permiten valorizar el trabajo de mujeres, niños y ancianos, que en la mayoría de los casos no tendrían otra opción de empleo. El ganado no solo satisface las necesidades directas de la familia, la venta de becerros y animales de desecho, permiten hacer frente a necesidades eventuales; la producción de leche y productos derivados generan un ingreso relativamente constante (Nahed, 2002). Todos estos componentes comprenden el agroecosistema ganadero, el cual puede ser estudiado en base a factores sociales, técnico-productivos y ecológicos (Figura 1), (Vilaboa, 2013).

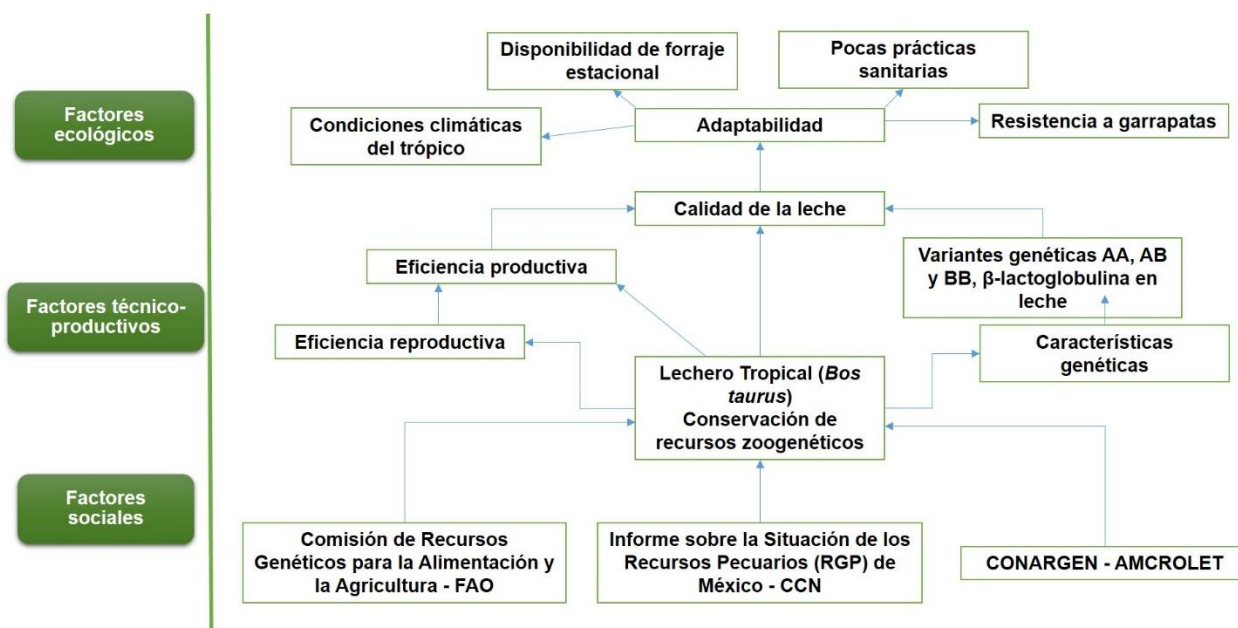


Figura 1. Factores sociales, técnico-productivos y ecológicos que interactúan en el agroecosistema ganadero con bovinos Lechero Tropical (elaboración propia).

### 2.2.1. Factores sociales

Los factores sociales que competen al ganado Lechero Tropical (LT), consideran la política nacional y estatal (Vilaboa, 2013), a la par de las acciones mundiales para la conservación de recursos zoogenéticos. En 1993 entró en vigor el protocolo de Nagoya, como convenio sobre la diversidad biológica del programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, este convenio es el instrumento internacional que aborda los temas de diversidad biológica con base en los objetivos de conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos. Sin embargo, fue hasta 2004 en la conferencia de las Partes del Convenio donde se elaboró un régimen internacional de acceso a los recursos genéticos y de participación en los beneficios con el fin de aplicar efectivamente los artículos del convenio así como sus tres objetivos (FAO, 2011).

En materia de conservación de recursos zoogenéticos, la Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ha incluido en su ámbito de trabajo, desde el año 1995, los recursos genéticos animales (da Silva, 2014). En septiembre de 2007, la comunidad internacional adoptó el primer plan de acción mundial para los recursos zoogenéticos en el que participaron 169 países, confirmando sus responsabilidades comunes e individuales respecto de la conservación, utilización sostenible y desarrollo de los recursos zoogenéticos para la alimentación y la agricultura; de la seguridad alimentaria mundial; de la mejora del estado nutricional de las personas; y del desarrollo rural (FAO, 2007).

El Informe sobre la Situación de los Recursos Genéticos Pecuarios (RGP) de México elaborado por el Comité Consultivo Nacional (CCN) menciona que el ganado criollo tiene un papel socio-económico y ecológico muy importante para diferentes regiones y que se asocian a poblaciones rurales de bajos recursos económicos. El ganado Lechero Tropical, se encuentra en hatos pequeños con sistemas de producción extensiva, los núcleos de este ganado se localizan en Veracruz, Tabasco, Campeche, Guerrero, Michoacán y recientemente en el estado de México. Actualmente, este ganado es criado por los socios de la Asociación de Mexicana de Criadores de Ganado Romosinuano y Lechero Tropical (AMCROLET), los cuales cuentan con bases de datos con parámetros productivos referentes a pesos y producción láctea (SAGARPA, 2014).

#### 2.2.2. Factores técnico-productivos

Los factores técnico-productivos del sistema de producción ganadero, lo comprenden los recursos utilizados para la producción mediante un manejo reproductivo y de mejoramiento genético, así como de sanidad (Vilaboa, 2013) y de manejo del ganado LT. Desde un punto de vista productivo-reproductivo, muchas de las áreas tropicales en México tienen vocación y tradición ganadera, pequeñas industrias lecheras y queseras, pero ninguna raza de origen europeo (*Bos taurus*) ha podido producir y reproducirse satisfactoriamente en estos ambientes como lo ha hecho el ganado Lechero Tropical (LT) (Santellano-Estrada *et al.*, 2011; Rosendo-Ponce y Becerril-Pérez, 2015).

El ganado LT comprende razas y estirpes *Bos taurus* productoras de leche, que descienden del ganado traído de la península ibérica al continente americano por los conquistadores a partir del siglo XV (de Alba, 2011), actualmente considerado como un

grupo racial nativo de América (Vilaboa *et al.*, 2012), está adaptado para producir leche de alta calidad alimentándose exclusivamente en pastoreo. Presenta una eficiencia reproductiva estimada en  $1.6 \pm 0.03$  servicios por concepción (Rosendo-Ponce y Becerril-Pérez, 2015). Destacando este como factor crucial que determina su productividad, ya que la eficiencia reproductiva determina en gran medida las ganancias del sistema de producción ganadera. En la actividad lechera, las ganancias dependen de la magnitud del período de reproducción de las hembras, pues la productividad depende de la frecuencia de parición a lo largo de la vida del animal (Casas y Tewolde, 2001). La lactancia en el LT no muestra el ascenso inicial (curva de lactancia) característico de los sistemas de producción en climas templados, los cuales utilizan razas europeas (*Bos taurus*). El índice de herencia y de constancia para producción de leche acumulada a 305 d es de  $0.24 \pm 0.036$  y  $0.43 \pm 0.068$ , respectivamente. Su producción total de leche por lactancia es de  $1174 \pm 11.4$  kg en promedio con alimentación a base de pastoreo, un ordeño al día y estación de sequía (Santellano-Estrada *et al.*, 2011).

En cuanto al manejo del hato LT, las vacas crían directamente a sus becerros; a su vez, éstos se requieren en el sistema para estimular la bajada de la leche y que sea posible ordeñarlas. Es decir, en el sistema se ordeñan vacas que están criando un becerro, porque producen suficiente leche tanto para mantenerlo en buen ritmo de crecimiento como para vender el volumen sobrante y generar los ingresos que el productor necesita para cubrir gastos menores relacionados con la operación del rancho y, en parte, de la familia (Suárez, 2008).

En cuanto a mejoramiento genético en ganado LT, las variantes genéticas identificadas por electroforesis capilar en zona libre fueron A y B, con genotipos AA, AB y BB

presentando frecuencias genotípicas de 0.14, 0.33 y 0.53, respectivamente. Actualmente se sabe que las variantes genéticas (A y B) de la  $\beta$ -lactoglobulina en la leche están asociadas con propiedades tecnológicas importantes en el procesamiento de lácteos, ya que influye directamente en la composición química de la leche en porcentajes de grasa, proteína, sólidos no grasos y sólidos totales, y ha sido identificado que estas características son mayores ( $p \leq 0.05$ ) en el genotipo BB (Meza-Nieto *et al.*, 2010). El progreso genético anual detectado en toros (7.7 kg por lactancia) y vacas (11.04 kg por lactancia) muestra el avance del programa de mejoramiento usado en el ganado LT (Santellano-Estrada *et al.*, 2011).

El ganado LT no presenta inmigración de otras razas conformándose como un hato núcleo puro (Canales *et al.*, 2014). Esto resulta una cualidad muy importante para la ganadería actual, ya que de los problemas a los que se enfrenta la ganadería especializada, el más importante es la alta presión de selección sobre muchas razas de ganado, dando lugar a un aumento indeseable en la endogamia, así como al deterioro de algunos rasgos funcionales que se seleccionan de forma indirecta (Leroy *et al.*, 2011).

### 2.2.3. Factores ecológicos

Los factores ecológicos en el agroecosistema ganadero lo comprende la interacción entre elementos como suelo, agua, clima y la vegetación natural con la productividad de la especie doméstica en cuestión y el efecto que ejerce el controlador, hombre y/o ganadero (socio-económico), (Ruiz-Rosado, 2006; Vilaboa, 2013). Bajo este contexto, modificaciones del fotoperiodo, temperatura, lluvias y disponibilidad de alimento son

factores ambientales que afectan diferentes momentos del desarrollo biológico de un individuo, debido a que cualquier alteración de estos puede desencadenar en un estado de estrés en un individuo. El estrés se manifiesta por la incapacidad de un animal para hacer frente a su entorno (Vélez y Uribe, 2010).

El ganado LT se caracteriza por su alta resistencia al estrés de las condiciones climáticas tropicales donde han evolucionado, indicando que poseen un conjunto de genes único para el ambiente específico, mostrando cualidades ya sea en producción, reproducción o su habilidad de adaptarse a las condiciones ambientales adversas que imperan en los agroecosistemas tropicales, sobre todo aquellas referentes a la frecuencia variable de vientos de gran intensidad que hacen descender la temperatura drástica y repentinamente, así como a la fluctuación errática de alimentos y enfermedades (Tewolde, 2007; Rosendo-Ponce y Becerril-Pérez, 2015).

Las prácticas sanitarias en ganado LT son pocas. El ganado se vacuna ocasionalmente contra rabia paralítica bovina, se aplican antibióticos locales en casos de mastitis severas y sueros en casos de anaplasmosis y piroplasmosis. El hato núcleo está certificado como hato libre de tuberculosis y brucelosis (Rosendo-Ponce y Becerril-Pérez, 2015).

En cuanto a parasitosis, no se aplican baños garrapaticidas ni se desparasita internamente el ganado LT (Rosendo-Ponce y Becerril-Pérez, 2015) evitando que los endo y ectoparásitos desarrollen resistencia a parasiticidas. Aun cuando se reconoce que la infestación por garrapatas es una de las parasitosis más importantes, ya que la presencia de garrapatas en el ganado bovino se traduce en pérdidas económicas para el productor, debido a que estos son ectoparásitos hematófagos que ocasionan una

diversidad de efectos negativos a sus hospedadores, producto de la transmisión de agentes patógenos como protozoos, bacterias, rickettsias y virus, además de la sustracción de sangre al hospedador (1 a 5 ml) y la inoculación de sustancias tóxicas (Hernández, 2005).

En un estudio, González-Cerón *et al.* (2009) determinaron que la media corporal de infestación de garrapatas por animal en ganado LT es muy baja, esta fue estimada en  $14.5 \pm 1.15$  bajo condiciones de manejo normal en pastoreo de ganado en el trópico. La importancia de estas características raciales radica en las posibles estrategias a utilizar para el control del parásito sobre la tasa de selección de individuos resistentes. Esta resistencia se ha atribuido a características propias de la raza como son: piel gruesa y pigmentada, pelo corto y escaso que incrementa su resistencia natural a la garrapata (CONARGEN, 2015).

Por lo tanto, en base a las características descritas del ganado Lechero Tropical, se considera que su conservación y desarrollo son de vital importancia (Vilaboa *et al.*, 2012).

### **2.3. Conservación de la biodiversidad**

La importancia que en el momento ha adquirido la conservación de la biodiversidad como factor para la sostenibilidad de la vida en el planeta, pone en relieve las repercusiones que pueden producir los cambios en la biodiversidad al comprometer las funciones del ecosistema y su capacidad para generar servicios esenciales para la sociedad y el medio ambiente. De allí la importancia de tener en cuenta el vínculo indisoluble del trinomio: biodiversidad – ecosistema (funciones) – agroecosistema (Velásquez, 2010).



La biodiversidad es el grado de variación de las formas de vida. Es la totalidad de genes, especies y ecosistemas de una región. Puesto que la eliminación de una sola especie puede afectar el funcionamiento de los ecosistemas locales e incluso mundiales, esfuerzos globales se han impulsado para aumentar la conciencia sobre la reducción de la biodiversidad de razas en los agroecosistemas ganaderos, promoviendo acciones para la conservación de las razas de animales de granja por su importancia como recursos zoogenéticos (Mara *et al.*, 2013; Sharma y Sharma, 2013).

Los objetivos primordiales de la conservación de recursos zoogenéticos son; a) mantener la variación genética como combinaciones de genes en una forma reversible y b) mantener genes específicos de interés (Mara *et al.*, 2013). El protocolo de Nagoya establece que la utilización de recursos genéticos es la realización de actividades de investigación y desarrollo sobre la composición genética y/o composición bioquímica de los recursos genéticos, incluyendo mediante la aplicación de biotecnología. Así mismo, menciona como biotecnología toda aplicación de tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos, o sus derivados, para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos (FAO, 2011).

Para conservar recursos zoogenéticos se han utilizado métodos *in situ*, es decir, en el hábitat natural o semi-natural, o en algún entorno especialmente diseñado. Es por esto que la conservación de las razas bovinas autóctonas se ha realizado principalmente mediante la formación de pequeñas poblaciones para la cría de ganado puro, sin embargo, este tipo de conservación tiene que ser apoyada por una estrategia *ex situ* (Miceikiene *et al.*, 2003; Sawicka *et al.* 2011; Sharma y Sharma, 2013).

De manera específica, la conservación *in situ* se refiere a mantener la raza dentro del sistema de producción ganadera, en su entorno, se trata de mejorar sus características de producción. Por otra parte, la conservación *ex situ* se refiere a conservar la raza fuera del hábitat natural, esta se desarrolla de dos formas básicas; la conservación *ex situ in vivo* se refiere a la salvaguarda de animales vivos en los zoológicos, parques naturales, granjas experimentales u otros centros especializados. La conservación *ex situ in vitro* es la criopreservación de material genético en forma haploide (semen y ovocitos), diploides (embriones) o secuencias de ADN (Lascuráin *et al.*, 2009; Mara *et al.*, 2013).

En los últimos años, los programas de conservación *ex situ in vitro* de los recursos genéticos ganaderos, han centrado el interés en la criopreservación de gametos, embriones y células somáticas, así como los testículos y los tejidos ováricos en un banco criogénico o criobanco. Un criobanco, es la congelación de muestras biológicas para mantener su integridad para una variedad de usos previstos y no previstos, ofrece oportunidades únicas para avanzar en el conocimiento básico de los sistemas biológicos y su evolución, además de que representa una forma útil para redirigir la selección o limitar la pérdida de la diversidad genética de una raza seleccionada, sirviendo como componente vital de los esfuerzos de recuperación de la variabilidad genética de razas en peligro de extinción y también para restaurar razas que se han extinguido como consecuencia del desuso, una epidemia o la destrucción de su hábitat natural (Lermen *et al.*, 2009; Leroy *et al.*, 2011; Sawicka *et al.* 2011; Mara *et al.*, 2013).

#### **2.4. Conservación por criopreservación**

La criopreservación es el uso de temperaturas ultra-bajas (-196°C) para preservar células vivas intactas, tejidos, gametos, oocitos, muestras de ADN, entre otros, con el fin de conservar su integridad estructural, manteniendo su viabilidad fisiológica y permitiendo almacenarlas por tiempo prolongado para uso futuro, garantizando un retorno a la viabilidad después del descongelamiento (Dessolle *et al.*, 2009; Akhoondi *et al.*, 2011; Sharma y Sharma, 2013; Do *et al.*, 2014).

Las diferentes etapas durante el proceso de criopreservación son: la exposición a agentes crioprotectores (ACP), enfriamiento, almacenamiento en nitrógeno líquido, descongelación o calentamiento, dilución y eliminación del crioprotector y retorno a un entorno fisiológico. El control en la formación de cristales de hielo durante el enfriamiento determinará la viabilidad del embrión después del calentamiento (Vanderzwalmen *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2012).

Los avances detrás de la criopreservación de células reproductivas y tejidos se han derivado de los principios científicos básicos desarrollados en los últimos 50 años. Estos principios básicos son los que han permitido desarrollar la capacidad de preservar y almacenar células vivas y tejidos reproductivos con éxito (Fuller, 2004; Woods *et al.*, 2004). Sin embargo, en contraste con el rápido desarrollo de los procedimientos en los años ochenta y principios de los años noventa del siglo pasado, los nuevos avances con profundas consecuencias prácticas sólo se han logrado recientemente, obligando a que los métodos tradicionales de criopreservación se vayan modificando, con la finalidad de obtener mejores tasas de supervivencia pos-criopreservación (Rodríguez y Jiménez, 2011).

En la ganadería bovina, el semen y los embriones congelados por criopreservación se han utilizado de forma rutinaria desde hace ya varios años (Dessolle *et al.*, 2009). Sin embargo, las investigaciones han dirigido su desarrollo hacia la criopreservación de oocitos y embriones obtenidos de vacas superovuladas o de tejido ovárico, los cuales necesitan de metodologías que garanticen una supervivencia y desarrollo aceptable del embrión (Vajta y Kuwayama, 2006).

Con la criopreservación de embriones se han mejorado los procesos de selección genética y también se han reducido significativamente los costos de los programas de cría, esto debido a que los embriones pueden estar disponibles cuando los animales receptores están naturalmente listos, evitando costosos tratamientos de sincronización. Además, el progreso en la criopreservación de material zoogenético permite la permanencia y un mejor manejo de las especies de ganado y otros animales, a la par de una mejor conservación de la biodiversidad (Woods *et al.*, 2004).

La criopreservación es un paso crucial para la aplicación práctica generalizada de otras técnicas en la embriología de los animales domésticos (Vajta y Kuwayama, 2006). El objetivo del desarrollo de estas biotecnologías en la ganadería, es la producción de embriones como base para otras biotecnologías (eclosión asistida, blastoceleotomía, entre otras.), que aseguren una alta tasa de preñez cuando son transferidos a hembras receptoras, obteniéndose el nacimiento de crías saludables (Fernández *et al.*, 2007). Estas biotecnologías se han logrado no sólo en el ratón, el humano, y los bovinos, sino también se han utilizado en caninos, caprinos, equinos, ovinos, conejos, ratas, porcinos y varias especies de mamíferos salvajes (Woods *et al.*, 2004).

Dentro del proceso de criopreservación existen diferentes factores que afectan su eficiencia, así como la supervivencia y viabilidad de los embriones después de la congelación y descongelación (Serrano *et al.*, 2002). Uno de estos factores es que los embriones pueden ser congelados en diferentes estadios de desarrollo, teniendo cada uno diferentes tasas de sobrevivencia, así como también ventajas y desventajas (Ávila *et al.*, 2006).

#### **2.4.1. Principios básicos en criobiología**

La criopreservación de las células germinales o embriones congelados presenta varios problemas, de los cuales los dos principales son: la formación de cristales de hielo y el riesgo de choque osmótico que puede ser inducido por el flujo de agua que se produce a través de las membranas celulares (Camus *et al.*, 2006). Estas fases críticas, que pueden derivar en algún tipo de lesión celular, son originadas durante el proceso de enfriado o el calentamiento. Durante el enfriado, las células están expuestas a la formación de hielo o a la deshidratación celular, al someterlas a cambios importantes en su entorno físico, como lo son las bajas temperaturas (al pasar de 37 a -196 °C). A altas velocidades de enfriamiento, las pérdidas de células están asociadas con la formación de hielo intracelular, ya que la formación de cristales de hielo puede causar daño mecánico intracelular. Cuando se enfrían lentamente, el daño se relaciona con la deshidratación celular (Dessolle *et al.*, 2009; Holovati *et al.*, 2009; Akhoondi *et al.*, 2011). Durante el calentamiento, el hielo se derrite y libera agua, lo que disminuye la osmolaridad del medio extracelular. Si este fenómeno es rápido, el agua en la célula

puede causar que se dilate y causar lisis por choque osmótico. Si el cambio es lento, la interfaz entre el hielo y el agua puede ser inestable y la recristalización puede causar nuevas lesiones. Por lo tanto, los objetivos primordiales durante la crioconservación son; limitar la formación de cristales de hielo, equilibrar los fenómenos de concentración de electrolitos-dilución y evitar el riesgo de choque osmótico al calentamiento, considerando que la velocidad de congelación y el volumen congelado son controlables (Dessolle *et al.*, 2009).

#### **2.4.2. Agentes crioprotectores**

De acuerdo con Fuller (2004), Holovati *et al.* (2009) y Shaluei *et al.* (2013), los agentes crioprotectores o crioprotectores, son cualquier aditivo, que se utiliza para proteger las células y organelos celulares, con el objetivo de mitigar la criolesión durante la criopreservación y almacenamiento a largo plazo en nitrógeno líquido, garantizando una mayor supervivencia celular durante y después de la congelación – descongelación. En los cincuenta años transcurridos desde el establecimiento del efecto crioprotector del glicerol, los bancos de células mediante la criopreservación se han convertido en una rutina en muchas áreas de la biotecnología y la medicina moderna. Adicionalmente el crioprotector es utilizado como un paso bastante convencional dentro del protocolo general de criopreservación (Fuller, 2004).

Actualmente, en base a sus características funcionales y a sus propiedades, los crioprotectores pueden ser clasificados en dos grupos diferentes, los de bajo peso

molecular también llamados difundibles o permeables y los de alto peso molecular denominados como no difundibles o no permeables (Dessolle *et al.*, 2009).

Los crioprotectores difundibles o permeables son pequeñas moléculas que atraviesan fácilmente las membranas celulares. Los más comunes son el etilenglicol (EG) el propilenglicol o PROH, glicerol, dimetil sulfoxido (DMSO) y metanol (MeOH) (Dessolle *et al.*, 2009; Shaluei *et al.*, 2013).

Los crioprotectores no difundibles o no permeables son moléculas como el polivinil pirrolidona (PVP) e hidroxietil almidón y los azúcares, como la sacarosa y la trehalosa (Shaluei *et al.*, 2013). Los polímeros como el PVP y el hidroxietil almidón no pueden penetrar la membrana celular, por lo que no puede proteger de manera eficiente la membrana interna. Sin embargo, los polímeros tienen muchos grupos polares que pueden formar enlaces de hidrógeno con los compuestos polares de la membrana celular, resultando en un efecto estabilizador, disminuyendo la formación extracelular de cristales de hielo (Quan *et al.*, 2009).

### **2.4.3. Efecto Crioprotector**

Los métodos para proteger células de los efectos perjudiciales de la congelación se han centrado en la adición de productos químicos crioprotectores, en donde los principales efectos están determinados por su capacidad para reducir el punto de congelación y descongelación y en disminuir la velocidad óptima de enfriamiento (Acker y McGann. 2003; Stolzing *et al.*, 2012).

Estos crioprotectores o hielo-bloqueantes impiden específicamente la formación de núcleos de hielo en la solución, y la unión entre estos núcleos, lo que frena el crecimiento de cristales de hielo durante el enfriamiento y el calentamiento. Al utilizar crioprotectores, las viscosidades extra e intracelulares aumentan bruscamente mientras que la energía térmica se reduce, no lo suficientemente para permitir las reacciones químicas. En este caso todas las reacciones biológicas se ralentizan a un mínimo que hace que el almacenamiento a largo plazo de las células, tejidos y órganos sea posible (Stolzing *et al.* 2012).

Prickett *et al.* (2015) describen que la formación de hielo intracelular (IIF) se ha relacionado con la muerte de células criopreservadas en suspensión. Se ha supuesto que las células se pueden enfriar por 2 a 10°C antes de que la formación de hielo intracelular (IIF) ocurra, pero las mediciones del grado de sobre-enfriamiento que las células pueden tolerar, a menudo son confundidas por cambios extracelulares de temperatura y soluciones de diferente osmolaridad (que afectan el volumen celular).

Dessolle *et al.* (2009) mencionan que la formación de enlaces de hidrógeno con moléculas de agua, disminuyen la temperatura para la formación de hielo. Utilizando crioprotectores en altas concentraciones, impiden la cristalización e incluso conducen a un estado llamado vitrificado o estado vítreo, pero sin cristales sólidos. Sin embargo, altas concentraciones de estos crioprotectores son tóxicas para las células a criopreservar, por lo que en la exposición al crioprotector deben limitarse el tiempo y las bajas temperaturas. Aunque con el uso de mezclas de crioprotectores se pueden utilizar concentraciones más bajas de todos o algunos de ellos.



Los daños provocados por la criopreservación implican muchos compartimentos celulares diferentes (Stolzing *et al.*, 2012), por lo que el efecto de los crioprotectores no difundibles es causar deshidratación del espacio intracelular y asociados con crioprotectores difundibles, contribuyen al aumento de la concentración intracelular mejorando el enfriamiento y previniendo el efecto de cristalización. Durante la descongelación, impiden el choque osmótico manteniendo la osmolaridad del medio extracelular (Dessolle *et al.*, 2009).

## **2.5. Características de embriones producidos *in vivo* e *in vitro*.**

La calidad de los oocitos y espermatozoides son factores determinantes que influyen en el desarrollo de blastocistos bovinos; es decir, una menor estimulación o manipulación se relaciona directamente con un mejor desarrollo (De Souza *et al.*, 2015) y su viabilidad a la criopreservación está ligada al proceso de producción (Giraldo *et al.*, 2012).

Todos los ovocitos y embriones sufren considerable daño morfológico y funcional durante la criopreservación, pero el alcance de la lesión, así como las diferencias en las tasas de supervivencia y de desarrollo, puede ser muy variable dependiendo de la especie, etapa de desarrollo y el origen (por ejemplo, producidos *in vitro* o *in vivo*, micromanipulados o no) (Pereira y Marques, 2008). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos que se han realizado para obtener embriones producidos *in vitro*, estos presentan un desarrollo y calidad más bajos que los obtenidos *in vivo* (Báez *et al.*, 2010).

En la producción de embriones *in vivo*, la variabilidad se ha relacionado con una falta de uniformidad en la respuesta ovárica a los tratamientos de superovulación necesarios

para aumentar el número de embriones. Entre las posibles causas destacan factores extrínsecos (origen, pureza y protocolo de administración de las gonadotropinas) e intrínsecos (raza, edad, estado nutricional y reproductivo); sin embargo, la información actual señala que los factores más importantes serían aquellos de origen ovárico. Posteriormente, los rendimientos se verán afectados por alteraciones en los procesos de fertilización y en la viabilidad de los embriones durante los estadios tempranos de desarrollo. En la producción *in vitro*, la variabilidad en los resultados se ha relacionado con la eficiencia en la recuperación y en los procesos de maduración y/o fertilización y cultivo (González, 2007).

En la producción *in vitro* (PIV) de embriones, el desarrollo temprano genera embriones menos viables debido a la inducción de estrés celular por las condiciones de cultivo, en relación con la concentración ideal de sustratos energéticos, diferencias metabólicas entre fases de preimplantación, la influencia de las combinaciones de sustrato, la importancia de glucógeno y triglicéridos como depósitos intracelulares, y cómo suplementos energéticos, son aspectos que confluyen en las tasas de gestación exitosas (De Souza *et al.*, 2015). Para ello, es necesario progresar en el entendimiento de los requerimientos embrionarios. El comprender la función que desempeña cada componente incluido en los medios de cultivo permitirá evitar alteraciones embrionarias de tipo morfológicas y/o fisiológicas (Mucci *et al.*, 2006a).

En los últimos años, se han realizado estudios para conocer cuáles son las condiciones necesarias para maximizar la capacidad de sobrevivencia de embriones para su cultivo *in vitro*, con la finalidad de obtener sistemas adecuados que permitan obtener altos porcentajes de embriones que alcancen los máximos estadios de desarrollo (Bosch *et*

*al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2013). Mucci *et al.* (2006a) mencionan que los componentes de los medios de cultivo están basados en parámetros biofísicos y elementos orgánicos e inorgánicos. Los parámetros biofísicos y elementos inorgánicos más importantes a controlar para el cultivo embrionario son los siguientes: osmolaridad, pH, CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y elementos como Na, K, Magnesio, calcio, bicarbonato, sulfatos y fosfatos. Como elementos orgánicos dos componentes son constantes en las formulaciones de los medios de cultivo; la fuente de energía (lactato, piruvato o glucosa) y la fuente de proteína, principalmente aminoácidos y algunas macromoléculas como la albumina.

En cuanto a la criopreservación, se ha reportado que los embriones bovinos producidos *in vitro* no sobreviven a la criopreservación así como los producidos *in vivo*, aunque hay que mencionar que se reportan diferencias entre razas. Algunas de las correlaciones indican que, entre más y más grandes sean las gotas lipídicas citoplásmicas de los embriones menor será su criotolerancia. Aunque se desconoce si el contenido de lípidos citoplasmáticos *per sé* o cambios asociados en la composición lipídica de las membranas celulares son los responsables de criotolerancias reducidas. Otro aspecto es que los embriones cultivados *in vitro* en ausencia de suero sanguíneo son más criotolerantes que los embriones cultivados en medios que contienen suero (Seidel, 2006).

## **2.6. Métodos de criopreservación de embriones**

Desde la primera criopreservación de embriones mamíferos lograda con éxito en los años 70, el progreso en criobiología, biología celular y embriología de los animales domésticos, ha permitido desarrollar grandes avances en las metodologías de

conservación, todos dirigidos a estandarizar técnicas simples y rápidas en su ejecución, económicas, aplicables a campo, y lo más importante, que ocasionen el menor daño posible al embrión (Dobrinsky, 2002; Cabrera y Fernández, 2006).

Actualmente los métodos de criopreservación los podemos clasificar de acuerdo a la velocidad de congelamiento y descongelamiento en protocolos de congelación lenta – descongelación lenta, congelación lenta – descongelación rápida, en los cuales la adición del crioprotector suele hacerse por pasos y el descenso de la temperatura se realiza lentamente en un congelador programable. La descongelación rápida se hace rápidamente a temperatura ambiente o en un baño de agua a 30°C para evitar la recrystalización (Ávila *et al.*, 2006).

Aunque los métodos de criopreservación no son métodos consensuales (Courbière *et al.*, 2009), tradicionalmente han habido dos enfoques para la criopreservación de embriones, el método convencional que consiste en una congelación lenta y la vitrificación que consiste en un enfriamiento muy rápido (Papadopoulos *et al.*, 2002; Pereira y Marques, 2008; Vásquez *et al.*, 2011), estas técnicas son paralelas a las opciones que se encuentran comúnmente en el área de la criobiología (Woods *et al.*, 2004).

### **2.6.1. Criopreservación por congelación lenta**

Para los propósitos de transferencia de embriones comerciales, se ha utilizado la tasa de equilibrio de congelación lenta o tradicional (Vajta, 2000). En enfriamiento lento o congelación lenta, los embriones son gradualmente pre-equilibrados en una solución

crioprotectora (CP) y después se enfrían a una “temperatura de siembra”, la temperatura a la que un dispositivo de pre-enfriado, tal como unas pinzas, se enfría en nitrógeno líquido para tocar el exterior del vial iniciando la congelación (-7°C). Los embriones se mantienen a esta temperatura durante el tiempo suficiente para que el hielo se equilibre (10-15 min). A continuación, los embriones se enfrían lentamente (menos de 1°C / min), aumentando la concentración de la solución extracelular y causando la deshidratación celular (Woods *et al.*, 2004). Lo que queda entre las crecientes masas de hielo es la denominada fracción no congelada, en el que se limitan todas las células y todos los solutos. Las concentraciones de azúcares, sales y crioprotectores (por ejemplo, glicerol) aumentan, mientras que el volumen de la fracción no congelada disminuye. El aumento en la fuerza osmótica provoca un flujo de salida del agua de las células (FAO, 2012). Después de que las células están lo suficientemente deshidratadas, la concentración intracelular es lo suficientemente alta para evitar la cristalización del hielo deletéreo, las células se sumergen y se almacenan en nitrógeno líquido (Woods *et al.*, 2004).

Los efectos biológicos del enfriamiento están dominados por la congelación del agua, lo que resulta en la concentración de los solutos que se disuelven en la fase líquida restante. Las teorías sobre lesiones en la congelación han previsto que los cristales de hielo perforan o desmenuzan las células, destruyéndolas por acción mecánica directa, o que el daño es a partir de los efectos secundarios a través de cambios en la composición de la fase líquida (Pegg, 2015).

Se necesita el enfriamiento lento a fin de permitir un flujo de salida suficiente de agua para minimizar la posibilidad de formación de hielo intracelular. A medida que continúa el enfriamiento, la viscosidad de la fracción no congelada en última instancia llega a ser

demasiado alta para cualquier cristalización. La fracción no congelada restante se convierte en un sólido amorfo que no contiene cristales de hielo (FAO, 2012).

### **2.6.2. Criopreservación por vitrificación**

El término de vitrificación en criobiología y la embriología se refiere a métodos donde toda la solución que contienen las muestras biológicas se vitrifica completamente. La definición física de vitrificación es la solidificación de una solución a bajas temperaturas sin la formación de cristales de hielo. Pero para evitar confusiones, la vitrificación es un proceso físico que permite la crioconservación sin formación de cristales de hielo, mediante la transformación de una solución altamente concentrada en un estado vítreo o amorfo. El fenómeno puede ser considerado como un aumento extremo de la viscosidad y requiere, ya sea velocidades de enfriamiento rápido o el uso de soluciones crioprotectoras (Vajta, 2000; Courbière *et al.*, 2009).

La vitrificación en la actualidad se está expandiendo rápidamente en la biología de la reproducción (Courbière *et al.*, 2009). Después de la primera aplicación exitosa de la vitrificación para la criopreservación de embriones, hace 15 años, fue dado por un método de aplicación rápida en la embriología de los animales domésticos (Vajta, 2000). En comparación con los tradicionales procesos de congelación lenta, su aplicación en el mundo ha ido creciendo exponencialmente y se puede aplicar tanto a ovocitos como a embriones en cualquier estadio (Vaamonde *et al.*, 2010).

La estrategia radical de la vitrificación ha resultado en algunas consecuencias positivas aparte de la eliminación total de la formación de cristales de hielo. El volumen de solución

de vitrificación en el cual queden contenidos y la alta concentración de crioprotectores utilizados en la vitrificación, son factores que mejoran el impacto de la vitrificación sobre ovocitos y embriones (Fernández *et al.*, 2012). Por otra parte, la vitrificación no requiere refrigeradores caros o habilidad especial y se puede realizar muy rápidamente. El presente y posible futuro papel de la vitrificación en la embriología de los animales domésticos, por lo tanto, no es reemplazar la congelación tradicional, sino ofrecer soluciones para las áreas especiales donde los otros métodos han fracasado en producir resultados satisfactorios (Vajta, 2000).

Estudiar la efectividad del proceso de criopreservación en embriones producidos *in vivo*, se fundamenta en la intención de la obtención de múltiples embriones para conservar el material genético por tiempo prolongado, hasta que se tengan las condiciones para realizar la transferencia o ser empleados para intercambio comercial dentro del país o incluso internacionalmente. Las técnicas de congelación lenta y vitrificación indudablemente constituyen una herramienta de soporte en estos casos. Por otra parte el empleo de la vitrificación permite obviar la necesidad del empleo de equipos de congelación costosos necesarios para utilizar la congelación lenta (Guerra *et al.*, 2012).

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1. Objetivo general

Evaluar el desarrollo *in vitro* de embriones de ganado Lechero Tropical obtenidos *in vivo* criopreservados por vitrificación o congelación lenta.

### 3.2 Objetivos específicos

- Comparar la respuesta superovulatoria de vacas Lechero Tropical (LT) con vacas F1 (LT x Tarentaise) utilizando dos protocolos de superovulación con o sin Gonadotropina Coriónica Equina (eCG).
- Determinar y comparar la tasa de sobrevivencia y desarrollo *in vitro* posdescongelación de embriones criopreservados por vitrificación y congelación lenta.
- Determinar y comparar la tasa de sobrevivencia y desarrollo *in vitro* posdescongelación de embriones Lechero Tropical (LT) y LT x Tarentaise (F1).

## 4. HIPÓTESIS

### 4.1 Hipótesis general

El método de criopreservación influye en el desarrollo *in vitro* de embriones de ganado Lechero Tropical.

### 4.2 Hipótesis específicas

- La respuesta al protocolo de superovulación es similar entre tratamientos y entre genotipos.



- Los embriones criopreservados mediante vitrificación tienen mayor tasa de desarrollo *in vitro* posdescongelación que los embriones criopreservados mediante congelación lenta.
- Los embriones LT (Puros) criopreservados por vitrificación tendrán un mejor desarrollo *in vitro* posdescongelación que los embriones LT x Tarentaise (F1).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Área de estudio y manejo de las donadoras

El estudio se realizó en las instalaciones del módulo de conservación y difusión de ganado Lechero Tropical del Colegio de postgraduados Campus Veracruz, localizado en el predio de Tepetates, Municipio de Manlio Fabio Altamirano, a 19° 11' LN y 96° 20' LO, a una altura de 23 msnm, con precipitación y temperatura media anual de 1060 mm y 26.4 °C. Con clima AW (w) (i) g, cálido subhúmedo con lluvias en verano (García, 1988; Santellano-Estrada *et al.*, 2011; Rosales, 2013).

Se utilizaron ocho vacas donadoras de la raza Lechero Tropical (LT) y ocho vacas F1 (LT x Tarentaise). Los criterios de selección fueron los siguientes: excelente historial reproductivo, cíclicas (segundo a tercer parto), sanas y libres de enfermedades reproductivas, con adecuado estado anatómico y fisiológico del tracto reproductivo y condición corporal mínima de 3 (escala de 1-5).

Las vacas donadoras fueron manejadas bajo las mismas condiciones; en ausencia del macho y en pastoreo rotativo, en potreros establecidos con gramas nativas (*Paspalum spp*), pasto estrella (*Cynodon plectostachyus*) y pasto par  (*Braquiaria mutica*). Se suplementaron con un alimento comercial con 18% de proteína cruda, a razón de 4 kg d<sup>-1</sup> animal<sup>-1</sup>, 100 g de sales minerales d<sup>-1</sup> animal<sup>-1</sup> y agua *ad libitum*. Se desparasitaron utilizando ivermectina al 3.15% por vía parenteral (Virbamec Platinum, laboratorios Virbac), paralelamente, se les aplicó selenito de sodio con vitamina E (Mu-se , laboratorios Intervet-Schering-Plough, Animal Health) y butafosfan con vitamina B<sub>12</sub> (CatosalMR con vitamina B<sub>12</sub>, laboratorios Bayer) la desparasitación y aplicación de vitaminas se realizó 15 y 5 días previos de iniciar el protocolo de superovulación.

## 5.2. Producción de embriones *in vivo*

Las donadoras se superovularon en cuatro grupos de cuatro vacas cada uno, conformado por dos vacas LT-puras y dos vacas F1 (LT x Tarentaise). Se les indujo la estimulación ovárica empleando dos protocolos de la superovulación a tiempo fijo, con y sin eCG (Folligon -Intervet), el cual consistió en lo siguiente:

**Día cero:** a cada donadora se le insert  un dispositivo intravaginal de liberación lenta de progesterona al 10% (1.38 g, CIDR  Pfizer) aplicando 2.5 mg de benzoato de estradiol (BE, Estrol) y 100 mg de progesterona, ambos por vía intramuscular (IM). **Día cuatro:** se aplicaron dos dosis de 2.5 ml de Folltropin – FSH (Folltropin-V, NIH-FSH-P1, Bioniche Animal Health Inc.), vía IM, con intervalo de 12 horas de aplicación (6:00 h y 18:00 h).

**Día cinco:** se aplicaron 2.0 ml de Folltropin – FSH vía IM en cada aplicación (6:00 h y

18:00 h). **Día seis:** se administraron 1.5 ml de Folltropin – FSH y 5 ml de PGF2 $\alpha$  vía IM (Lutalyse, Dinoprost-trometamina, laboratorios Pfizer), por la mañana (6:00 h) y por la tarde (18:00 h). **Día siete:** por la mañana se administró 1.0 ml de FSH vía IM y 1.0 ml de eCG (Folligon®) y por la tarde se retiró el dispositivo CIDR® y se aplicó 1.0 ml de Folltropin – FSH vía IM, más 1.0 ml de eCG. **Día ocho:** se aplicaron 5ml de Hormona Liberadora de Gonadotropina – GnRH (Gonadorelina Fertagyl, Intervet) vía IM (6:00 h) y por la tarde se realizó la primer inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) (18:00 h) correspondiendo a las 36 h de retirado el CIDR y la segunda IATF se realizó a las 48 h (6:00 h, día nueve).

### 5.3. Colecta de embriones

En el **día 15** del protocolo de superovulación, los embriones fueron colectados por el método no quirúrgico, procediendo de la siguiente forma: por palpación ovárica transrectal se determinó el número de cuerpos lúteos antes de iniciar la extracción embrionaria. Posteriormente se administró como anestesia regional 7–10 ml de lidocaína al 2% en la región epidural, previamente desinfectada. Después se desinfectó el área perianal y vulvar para realizar la extracción de embriones. Para la colecta de embriones por lavado uterino, se introdujo un catéter Foley de dos vías (20fr con globo de 30cc); se fijó la primera vía de la sonda en la curvatura mayor de cada cuerno uterino y la segunda vía se conectó a un circuito cerrado (filtro Emcon). A través de la primer vía, fue introducido el medio de lavado. Se utilizó por cada cuerno uterino 500 ml de solución de lavado compuesta por 150 ml animal<sup>-1</sup> de medio de recolección (Vigro complete Flush

Solution, Bioniche) diluidos en 850 ml animal<sup>-1</sup> de solución salina (Hartman). Los embriones se colectaron de ambos cuernos uterinos con un filtro Emcon. Al finalizar la colecta se les aplicó 25 mg de PGF2 $\alpha$  para inducir la luteólisis y evitar una gestación no programada.

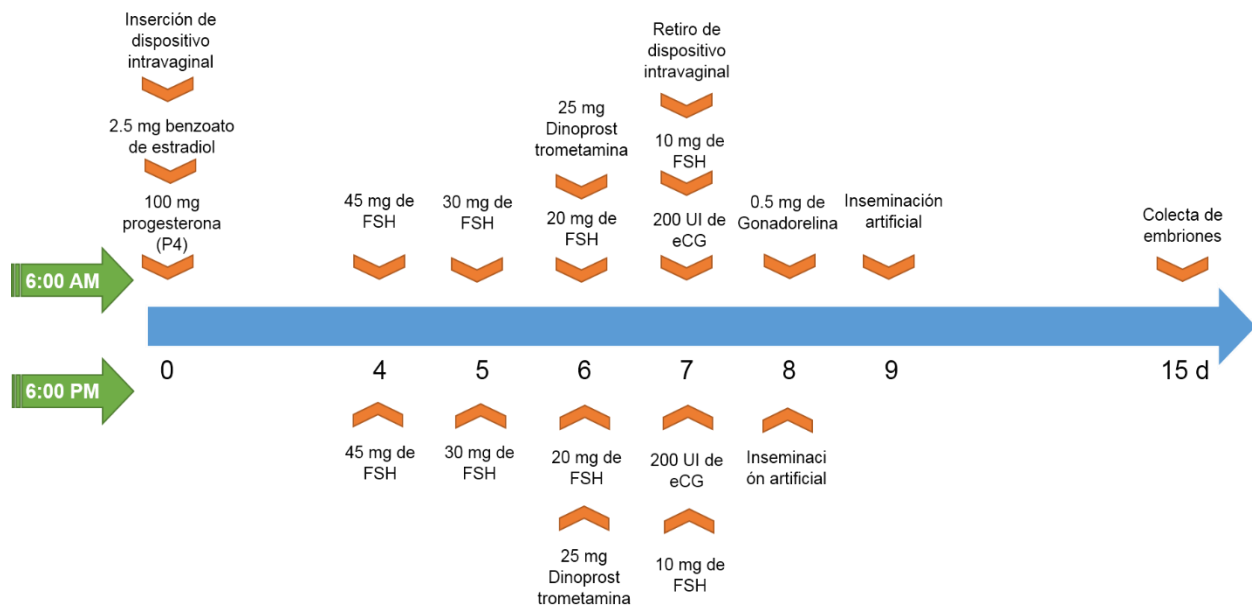


Figura 2. Protocolo de superovulación de vacas donadoras para la obtención de embriones.

Una vez terminada la colecta, el volumen de solución que contuvo los embriones fue depositado en platos de Petri para ser localizados y seleccionados utilizando un microscopio (Estereoscopio ZS-6 plus, Bausch & Lomb). Posteriormente, los embriones se colocaron en un medio de mantenimiento (Vigro Holding Plus, Bioniche) y fueron clasificados y seleccionados de acuerdo con su estadio de desarrollo (Mórula a blastocisto) y en cuanto a su calidad (calidad 1 y 2) (Bo y Mapletoft, 2013).

#### 5.4. Superovulación - Variables respuesta

- Cuerpos lúteos (NCL). Número de cuerpos lúteos contados en cada ovario por medio de palpación transrectal momentos antes de iniciar la colecta de embriones.
- Ovocitos no fertilizados (ONF). Número de óvulos recolectados sin fertilizar.
- Embriones degenerados (ED). Número de embriones con defectos; numerosos blastómeros extruidos, células de diferentes tamaños, grandes vesículas pero masa embrionaria viable de apariencia.
- Mórulas (MOR). Se identificó por presentar una bola solidad de blastómeros con una zona pelúcida.
- Blastocistos (BLA). Se identificaron por una pronunciada diferenciación de la capa exterior y el trofoblasto más oscuro, la masa celular interna evidentemente más compacta, el blastocele es muy prominente con el embrión que ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.
- Embriones transferibles (ET). Número de embriones con calidad 1 y 2, entre los cuales se encuentran las mórulas, blastocisto joven, blastocisto y blastocisto expandido.
- Total de estructuras recolectadas (TER). Número total de estructuras colectadas en sus diferentes estadios, incluyendo ovocitos no fertilizados.

#### 5.5. Criopreservación

Para el proceso de criopreservación, se utilizaron 71 embriones provenientes de 16 vacas donadoras, los cuales fueron asignados aleatoriamente a cuatro tratamientos; por

técnica (curva lenta o vitrificación) y por genotipo (Lechero Tropical (LT) o LT x Tarentaise (TA)).

#### 5.6. Criopreservación por congelación lenta

Utilizando un protocolo estándar de congelación lenta, los embriones se colocaron en un plato de Petri con medio de congelación Solución Buffer Fosfato (PBS) y 1.5 M de etilenglicol (EG), a temperatura ambiente (20-25°C aproximadamente), en un solo paso, de 10 – 30 minutos de duración. Posteriormente los embriones se introdujeron en pajillas de 0.25 ml y las pajillas se colocaron en un equipo de congelación Freeze Control, modelo CL 5500 (Cryologic), con la finalidad de estabilizar la temperatura a -6.0 °C durante dos minutos. La cristalización (seeding) se realizó poniendo en contacto la superficie de la pajilla con una pinza metálica enfriada en N<sub>2</sub>L. Una vez efectuado la cristalización, se mantuvo la temperatura estable durante 10 minutos (periodo de estabilización) y posteriormente se sometieron a una segunda fase de enfriamiento, en la que se desciende la temperatura, a una velocidad aproximada de 0.5°C/min, hasta llegar a -30°C o -35°C, buscando establecer un adecuado balance entre deshidratación y formación de hielo intracelular. Una vez alcanzado este punto, las pajillas se retiraron del equipo y se sumergieron en N<sub>2</sub>L y almacenándolas en un termo criogénico hasta su posterior descongelación.

### 5.7. Criopreservación por vitrificación

Para vitrificar los embriones, se puso en un plato de Petri una gota de solución de equilibrio (SE) y cuatro gotas de solución de vitrificación (SV) de 20 µl cada una, posteriormente se colocaron los embriones en la gota de SE durante 5 minutos y después se pasaron sobre las cuatro gotas de SV manteniéndolas durante 5, 5, 10 y 10 s en cada gota, respectivamente. En menos de 30 s se colocaron en el Criotop y se sumergieron en N<sub>2</sub>L, colocándoles una tapa (pajilla) para su almacenamiento en un termo criogénico hasta su posterior desvitrificación.

### 5.8. Descongelado y cultivo *in vitro*

Para descongelar los embriones criopreservados por congelación lenta, las pajillas fueron sacadas del termo criogénico exponiéndolas 8 s a temperatura ambiente, después se sumergieron en baño maría, con temperatura de 35°C durante 30 s, al sacar las pajillas fueron secadas con una toalla de papel, se les corto una punta para después colocar los embriones en un plato Petri para su evaluación morfológica en medio de cultivo IVC3 TM (InVitroCare®; libre de fosfato y niveles elevados de glucosa, suplementado con aminoácidos y vitaminas).

Para desvitrificar los embriones, se utilizó una solución de calentamiento (TS), compuesta por PBS con SSS al 20% más 1.0 M de sucrosa; la solución de dilución (DS) compuesta por PBS con SSS al 20% más 0.5 M de sucrosa y la solución de lavado (WS) compuesta por PBS con SSS al 20%. Se colocará una gota de 300µl en un plato de Petri

a 37°C y en otro plato se colocaron dos gotas de DS y 3 gotas de WS de 20 µl cada una a temperatura ambiente.

La desvitrificación (calentamiento) de los embriones se realizó destapando el Criotop, sacándolo del N<sub>2</sub>L y sumergiéndolo inmediatamente en TS durante 1 minuto, después los embriones se colocaron en DS durante 3 minutos y consecutivamente fueron colocados en WS durante 3 minutos en cada gota. Posteriormente se colocaron en medio ICV3 para su cultivo.

Para su cultivo *in vitro* se utilizó una incubadora (Heraeus Instruments, Function Line) a 38.5°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de aire y 95% de humedad. Fueron monitoreados cada 24 h hasta las 72 h, evaluando el estadio de desarrollo y registrando el estadio máximo que alcancen a las 72 h.

## 5.9. Análisis estadístico

Superovulación. Las variables de respuesta se analizaron con el siguiente modelo experimental de efectos fijos:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + T_j + (GT)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = Medición del  $i$ -ésimo genotipo de la  $j$ -ésima gonadotropina de la  $k$ -ésima repetición.

$\mu$  = Constante que caracteriza a la población.

$G_i$  = Efecto de  $i$ -ésimo genotipo ( $i = 1, 2$ ).



$T_j$  = Efecto del  $j$ -ésima gonadotropina ( $j = 1, 2$ ).

$(GT)_{ij}$  = Efecto de la interacción del  $i$ -ésimo genotipo con la  $j$ -ésima gonadotropina.

$E_{ijk}$  = Error experimental,  $E_{ijk} \sim \text{IIDN}(0, \sigma^2)$ .

Criopreservación. Las variables de respuesta se analizaron con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + G_j + (CG)_{ij} + V_{k(ij)} + P_l + (CP)_{il} + (GP)_{jl} + (CGP)_{ijk} + E_{ijkl}$$

Donde:

$\mu$  = Constante que caracteriza a la población.

$C_i$  = Efecto de  $i$ -ésimo método de criopreservación ( $i = 1, 2$ ).

$G_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo genotipo ( $j = 1, 2$ ).

$(CG)_{ij}$  = Efecto de la interacción del  $i$ -ésimo método de criopreservación con el  $j$ -ésimo genotipo.

$V_{k(ij)}$  = Efecto de la  $k$ -ésima vaca, anidada en el  $i$ -ésimo método de criopreservación y  $j$ -ésimo genotipo. ( $k = 1, 2, 3, \dots, 16$ ).  $V_{k(ij)} \sim \text{IIDN}(0, \sigma^2_a)$ .

$P_l$  = Efecto de  $l$ -ésimo periodo ( $l = 1, 2, 3, 4$ ).

$(CP)_{il}$  = Efecto de la interacción del  $i$ -ésimo método de criopreservación con el  $l$ -ésimo periodo.

$(GP)_{jl}$  = Efecto de la interacción del  $j$ -ésimo método de criopreservación con el  $l$ -ésimo periodo.

$(CGP)_{ijl}$  = Efecto de la interacción del  $i$ -ésimo método de criopreservación,  $j$ -ésimo método de criopreservación y  $l$ -ésimo periodo.

$E_{ijkl}$  = Error experimental,  $E_{ijk} \sim \text{IDN}(0, \sigma^2)$ .

Los datos fueron analizados con el SAS 9.4, utilizando los procedimientos GLM, MIXED y la prueba de Tukey. La tasa de eclosión fue calculada de acuerdo con Martínez y Valcárcel (2008) como el número de embriones que eclosionaron sobre el número de embriones colocados en cultivo.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Obtención de embriones *in vivo*

En el cuadro 1, se presentan los resultados obtenidos durante el proceso de superovulación para la obtención *in vivo* de embriones. No se encontraron diferencias significativas entre genotipos y protocolos en cuanto a las siguientes variables de estudio (NCL, ONF, ED, MOR, BLA, ET Y TER), no se mostró interacción entre genotipos ni entre protocolos de superovulación.

Cuadro 1. Respuesta a la superovulación de vacas Lechero Tropical (LT) y F1 LT x Tarentaise (TA) con o sin gonadotropina coriónica equina (eCG) (medias mínimo cuadráticas  $\pm$  error estándar).

	NCL	ONF	ED	MOR	BLA	ET	TER
<b>Genotipo</b>							
<b>LT</b>	10.9±3.9	1.8±1.8	1.9±1.6	2.6±1.9	4.4±4.0	5.6±3.4	9.6±5.0
<b>TA</b>	13.7±8.9	0.6±1.1	3.3±3.6	1.4±1.7	4.7±2.7	5.7±2.7	8.6±4.2
<b>eCG</b>							
<b>Con</b>	11.7±4.4	0.7±1.1	3.6±3.4	2.0±1.8	5.4±3.1	6.6±2.8	10.1±3.2
<b>Sin</b>	12.6±8.3	2.0±2.0	1.6±1.7	2.3±2.0	3.9±3.3	4.8±3.2	8.3±5.4

LT= Lechero Tropical; TA= LT x Tarentaise; (P > 0.05); NCL= Número de Cuerpos Lúteos, ONF= Ovocitos No Fertilizados, ED= Embriones Degenerados, MOR= Mórulas, BLA= Blastocistos, ET= Embriones Transferibles, TER= Total de Estructuras Recolectadas.

#### 6.1.1. Número de Cuerpos Lúteos

La variable Número de Cuerpos Lúteos (NCL), no presentó diferencia estadística (P>0.05) entre genotipos (LT=10.9±3.9; TA=13.7±8.9), ni entre tratamientos (11.7±4.4 y 12.6±8.3) con y sin eCG, respectivamente (Cuadro 1). Estos resultados demuestran que el vigor híbrido obtenido en los animales F1 (TA) no influye en el número de CL. En cuanto al componente racial, estos resultados son similares a los obtenidos por Rosales *et al.* (2013) quienes reportan 9.0±1 CL al superovular vacas LT con una dosis de 260 mg de FSH y superior a lo reportado por Dong-Soo *et al.* (2007) empleando vacas nativas Coreanas (7.9±1.0 y 8.3±1.1, CL) utilizando dosis diferentes de FSH; Bülbül *et al.* (2010)

consiguieron un resultado similar al utilizar vacas Pardo Suizo encontrando  $9.2\pm 1.6$  CL. Al igual Lozano *et al.* (2010) reportan promedios de  $11.9\pm 1.2$  CL en vacas Holstein. Resultados similares han sido reportados al utilizar vacas híbridas para carne de la raza Kamphaeng Saen (Charolais 50, Brahaman 25 y Thai 25%) de Tailandia obteniendo  $10.33\pm 0.89$  y  $13.00\pm 0.89$  CL al aplicar dosis de 200 y 250 mg de FSH.

Sin embargo, Aké *et al.* (1995) superovularon vacas de componentes raciales diferentes (*Bos taurus*) obteniendo resultados similares a los reportados en este estudio, al emplear razas Gelbvieh y Pardo Suizo ( $10.8\pm 4.9$  CL) y diferentes en los genotipos *Bos indicus* (Brahman e Indobrasil) ( $15.1\pm 7.4$  CL) aplicando dosis decrecientes de FSH

Como parte del protocolo estándar de superovulación y colecta de embriones, los ovarios son palpados al inicio del procedimiento del lavado uterino para obtener los embriones y sirve como indicativo de la respuesta animal al protocolo de superovulación y como parámetro de referencia para el número de estructuras a ser colectadas durante el lavado uterino. En este trabajo, el número de cuerpos lúteos palpados en promedio nos permite determinar que la respuesta fue excelente, tanto en hembras LT como en vacas F1.

#### 6.1.2. Ovocitos No Fertilizados (ONF)

En cuanto a esta variable, no se observó diferencia estadística ( $P>0.05$ ), entre genotipos (LT=  $1.8\pm 1.8$ ; F1=  $0.6\pm 1.1$ ) ni entre tratamientos ( $0.7\pm 1.1$ ;  $2.0\pm 2.8$ ) con y sin eCG, respectivamente. El número de ovocitos no fertilizados en este trabajo fue muy bajo, similar a lo reportado por Rosales *et al.* (2013) quienes utilizaron dosis de 260 y 210 mg de FSH ( $2.0\pm 0.6$  y  $0.5\pm 0.3$  ONF) para superovular vacas LT. Incluso, estos resultados

son similares a lo realizado por Canseco *et al.* (1992) utilizando vacas Holstein tratadas con diferentes dosis de FSH (30, 35, 37 y 40 mg) reportaron una media de  $1.4 \pm 0.3$  ONF. Salgado *et al.* (2011) reportan una respuesta similar ( $1.33 \pm 2.3$  ovocitos sin fertilizar) utilizando ganado brahmán. Incluso utilizando dosis alta (400mg) de FSH Lopes da Costa *et al.* (2001) obtuvieron  $0.7 \pm 0.3$  ONF al superovular vacas de la raza Mertolengo de Portugal. La baja cantidad de ONF obtenida en este estudio similar a lo reportado en los trabajos antes mencionados y nos permite aseverar que la respuesta obtenida es óptima conforme a lo reportado por otras razas y con diferentes dosis de FSH, aunque no se observó diferencia entre tratamientos con y sin eCG, el menor número de ONF se contabilizó con la aplicación de eCG.

### 6.1.3. Embriones Degenerados (ED)

No se observó diferencia estadística ( $P > 0.05$ ) entre genotipos (LT= $1.9 \pm 1.6$ ; F1= $3.3 \pm 3.6$ ) ni entre tratamientos ( $3.6 \pm 3.4$ ;  $1.6 \pm 1.7$ ) con y sin eCG, respectivamente (cuadro 1) en la variable de ED. Estos resultados son similares a lo reportado por Rosales *et al.* (2013) quienes obtuvieron  $2.3 \pm 0.6$  ED al superovular vacas LT con dosis de 260 mg de FSH. Incluso estos resultados son similares a los reportados por Bülbül *et al.* (2013) emplearon dos protocolos de superovulación en vacas Pardo Suizo obteniendo  $1.4 \pm 0.7$  y  $0.8 \pm 0.6$  ED. En trabajos empleando genotipos *Bos indicus*, reportan  $3.19 \pm 3.09$  ED al superovular vacas de la raza Brahman (Salgado *et al.*, 2011) y  $2.67 \pm 1.65$  ED en vacas Gyr superovuladas con una dosis de 200 mg de FSH (Motta *et al.*, 2011).

En base a lo antes mencionado, podemos determinar que el componente racial difiere en la cantidad de embriones degenerados colectados, siendo que el genotipo *Bos taurus* es el que presenta menor número de embriones degenerados comparado con el *Bos indicus*.

#### 6.1.4. Mórulas (MOR)

No se observó diferencia estadística ( $P>0.05$ ) en la variable MOR, ni entre genotipos (LT=2.6±1.9; F1=1.4±1.7) ni entre tratamientos (2.0±1.8, 2.3±2.0) con y sin eCG, respectivamente (cuadro 1). Bono *et al.* (1991) observaron valores similares de 2.9±0.7 MOR en vacas Simmental de Italia superovuladas con 3000 UI de Gonadotropina de Suero de Yegua Preñada (PMSG, por sus siglas en inglés). El número reducido de embriones recolectados en estadio de mórula, pudo deberse a que los embriones se recolectaron en el día siete después de realizada la IA de acuerdo a su grado de desarrollo.

#### 6.1.5. Blastocistos (BLA)

No se observó diferencia estadística significativa ( $P>0.05$ ) entre genotipos ni entre tratamientos con y sin eCG para la variable BLA (Cuadros 1). Bono *et al.* (1991), en vacas Simmental de Italia superovuladas con Gonadotropina Menopáusica Humana (hMG) obtuvieron 4.6±1.0 BLA. La cantidad de embriones recolectados en estadio de

blastocisto en este estudio puede considerarse satisfactoria y acorde al grado de desarrollo en la recolecta del día siete después de realizada la IA.

#### 6.1.6. Embriones Transferibles (ET)

No se observó diferencia estadística significativa ( $P>0.05$ ) entre genotipos ( $LT=5.6\pm3.4$ ;  $F1= 5.7\pm2.7$ ), ni entre tratamientos ( $6.6\pm2.8$ ;  $4.8\pm3.2$ ) con y sin eCG, respectivamente, en la variable ET (Cuadro 1). En ganado LT, Rosales *et al.* (2013), obtuvieron una media de  $3.2\pm0.7$  y  $3.0\pm0.8$  embriones transferibles al superovular vacas con dosis diferentes de FSH. En otro trabajo realizado con ganado Criollo Limonero, Roa *et al.* (2013), obtuvieron una respuesta menor a lo reportado en este trabajo, alcanzando una media de  $2.2\pm0.4$ . Dong-Soo *et al.* (2007) utilizando vacas nativo Coreanas superovuladas con dos dosis diferentes de FSH, obtuvieron  $3.4\pm0.8$  y  $3.2\pm0.7$  embriones transferibles, respectivamente. Bülbül *et al.* (2010) obtuvieron  $4.7\pm1.6$  ET en vacas Suizo Pardo de Turquía, posteriormente Bülbül *et al.* (2013) utilizando dos diferentes implantes en el protocolo de superovulación, reportan  $4.4\pm1.1$  y  $4.8\pm1.6$  embriones transferibles en ganado Pardo Suizo. El número mayor de cinco ET obtenido en este estudio se considera satisfactorio y acorde con la media reportada en diferentes programas de superovulación. ET es la variable de respuesta más importante de una ovulación múltiple ya que a mayor número de embriones transferibles se tienen más posibilidades de producir una gestación exitosa (Schiewe *et al.*, 1987).

#### 6.1.7. Total de Estructuras Recolectadas (TER)

No se observó diferencia estadística ( $P>0.05$ ) entre genotipos ( $LT=9.6\pm 5.0$ ;  $F1=8.6\pm 4.2$ ) ni entre tratamientos ( $10.1\pm 3.2$ ;  $8.3\pm 5.4$ ) con y sin eCG en TER, respectivamente (Cuadros 1). Resultados similares realizados con ganado LT, utilizando una dosis de 260 mg de FSH Rosales *et al.* (2013) obtuvieron un  $10.3\pm 1.5$  de TER. Estos resultados permiten demostrar la excelente respuesta del ganado LT a los programas de ovulación múltiple.

Dong-Soo *et al.* (2007) al superovular vacas nativas de Corea utilizando 24 y 30 mg de FSH obtuvieron  $6.2\pm 0.9$  y  $6.4\pm 1.8$  TER. Sugano y Watanabe (1997), obtuvieron  $6.4\pm 5.3$ ,  $7.2\pm 4.0$ ,  $4.3\pm 4.4$  TER con dosis de 16, 24 y 30 mg de FSH. Bülbül *et al.* (2010) con dosis de 400 mg de FSH obtuvieron  $5.9\pm 1.7$  TER. Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los reportados por Barati *et al.*, 2006; Motta *et al.*, 2011; Nilchuen *et al.*, 2011; Nilchuen *et al.*, 2012, quienes obtuvieron  $8.2\pm 1.11$ ,  $9.83\pm 9.04$ ,  $6.67\pm 1.19$  y  $13.25\pm 4.30$  TER utilizando genotipos *Bos indicus* y *Bos taurus*.

En un programa de superovulación el TER es un indicativo de la respuesta de las donadoras al protocolo utilizado, sin embargo dentro del TER se incluye ONF y ED, los cuales no son un aporte positivo para un futuro programa de transferencia de embriones.

## **6.2. Criopreservación y desarrollo embrionario**

En el cuadro 2, se observan los resultados obtenidos de la evaluación en la criopreservación y el desarrollo de embriones cultivados *in vitro*. Se evaluaron 71 embriones criopreservados en diferente estadio de desarrollo; 17 mórulas, 22 blastocistos jóvenes, 19 blastocistos y 13 blastocistos expandidos, los cuales se



distribuyeron entre los tratamientos de la siguiente forma: 21 embriones de la raza Lechero Tropical (CLT) y 17 embriones de vacas CLT x Tarantes (TA) criopreservados por congelación lenta (Cl) ( $n=38$ ), por el método de vitrificación (Vt) se criopreservaron 17 embriones de vacas LT y 16 embriones de vacas TA ( $n=33$ ). Los embriones seleccionados fueron asignados a los tratamientos de acuerdo al número de embriones viables extraídos por vaca, de tal manera que la mitad de los embriones se congelaran por CL y la otra mitad por Vt. Después de descongelarlos, se comparó el efecto del método de criopreservación sobre el desarrollo *in vitro* cada 24 h hasta las 72 h.

Cuadro 2. Desarrollo *in vitro* de embriones de la raza Lechero Tropical (LT) y F1 LT x Tarentaise (TA) criopreservados por congelación lenta (Cl) o vitrificación (Vt) (Medias mínimo cuadráticas  $\pm$  error estándar).

Genotipo	Periodo				GLOBAL
	Embrión descongelado	24 h	48 h	72 h	
LT	2.86 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	3.74 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	4.26 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	4.10 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	3.74 $\pm$ 0.38 <sup>B</sup>
TA	3.57 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	5.06 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	5.98 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	6.38 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	5.25 $\pm$ 0.35 <sup>A</sup>
GLOBAL	3.22 $\pm$ 0.28 <sup>Z</sup>	4.40 $\pm$ 0.28 <sup>Y</sup>	5.12 $\pm$ 0.28 <sup>X</sup>	5.23 $\pm$ 0.28 <sup>X</sup>	

<sup>a - b, A-B</sup> Letras diferentes entre hileras indican diferencia estadística ( $p \leq 0.01$ ). X – Z: Letras diferentes entre columnas indican diferencia estadística ( $p \leq 0.01$ ). Escala de evaluación embrionaria de 1 a 7, donde: 1 = degenerado, 2 = mórula, 3 = blastocisto joven, 4 = blastocisto, 5 = blastocisto expandido, 6 = blastocisto eclosionando, 7 = blastocisto eclosionado.

### 6.2.1. Efecto del método de criopreservación

No se observó diferencia estadística ( $P > 0.05$ ) entre técnicas de criopreservación de embriones, sin embargo, al calcular la tasa de eclosión embrionaria de acuerdo a lo propuesto por Martínez y Vacárcel (2008) para la técnica de vitrificación fue del 60.61% (20/33 embriones) y 36.84% (14/38 embriones) para los embriones criopreservados por congelación lenta, reflejando la capacidad de criotolerancia de los embriones con respecto de la técnica empleada al reconstituir su estructura y continuar con su desarrollo embrionario. Estos resultados son similares a los reportados por Nedambale et al. (2004) quienes obtuvieron la mayor tasa de desarrollo embrionario ( $P < 0.05$ ) mediante vitrificación (60%) posdescongelación en comparación con la congelación lenta (31%). Mucci et al. (2006b), obtuvieron una tasa de eclosión mayor en los embriones criopreservados por vitrificación en comparación con los de congelación lenta (43% vs 12%, respectivamente,  $P < 0.01$ ).

En contraste, los resultados reportados por Guerra et al. (2012) difieren de los obtenidos en este estudio, al encontrar diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la tasa de eclosión de embriones bovinos producidos *in vivo* e *in vitro* evaluados a las 24 y 48 h, utilizando un protocolo de congelación lenta y dos de vitrificación, siendo los tratamientos que involucraban embriones producidos *in vivo* los que presentaron una mayor tasa de eclosión con 76.67% (23/30) de los embriones criopreservados por congelación lenta y 66.67% (20/30) y 60% (18/30) de embriones eclosionados utilizando la vitrificación; comparándolos con los embriones obtenidos *in vitro* con una tasa de eclosión

embrionaria de 56.67% (17/30) criopreservados por congelación lenta y 36.67% (9/30) y 40% (12/30) de embriones eclosionados empleando la vitrificación. Las diferencias encontradas en lo reportado por este último autor y este trabajo, con respecto a la tasa de eclosión embrionaria y el método de criopreservación, pueden ser debidas al tipo de crioprotector empleado y los tiempos de exposición a estos.

Al analizar el efecto directo de la criopreservación independientemente de la técnica empleada en este trabajo (Cuadro 2), podemos observar que la calidad de los embriones posdescongelación se ve disminuida, aunque no presenta diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), este efecto es aún mayor utilizando la técnica de congelación lenta que con vitrificación. En un trabajo utilizando embriones bovinos producidos y cultivados *in vitro* y criopreservados por congelación lenta y vitrificación, Kaidi *et al.* (2001) reportan que ambos procedimientos redujeron el número de células inmediatamente después de la descongelación. Sin embargo, el número de células del trofoectodermo fue menor en los embriones congelados que en los vitrificados. En relación con esto, los blastocistos congelados mostraron una disminución en la glucosa, piruvato, y el consumo de oxígeno, aunque esos parámetros no se alteraron en los embriones vitrificados. También observaron un aumento de la actividad glucolítica en embriones congelados, lo que indica una respuesta de estrés a este procedimiento.

Los trabajos de Rizos *et al.* (2003); Ávila-Portillo *et al.* (2006) y Walker *et al.* (2006) han permitido atribuir como otras causas; el tamaño celular y las diferencias estructurales entre mórulas y blastocistos al momento de criopreservarlos, mencionan también que la relación superficie/área de la célula están relacionados con su criotolerancia, además de la deshidratación celular ocurrida durante el proceso de congelación debido a cambios

en la permeabilidad celular. Sin embargo, el presente trabajo no estuvo enfocado en realizar un análisis de dichas condiciones.

Lo antes mencionado corresponde a lo encontrado por Rafagnin *et al.* (2015), utilizaron blastocistos (BL) y blastocistos expandidos (BE) criopreservados por vitrificación y congelación lenta, obteniendo un número mayor de embriones eclosionados al utilizar BE vitrificados (67.4 %) que utilizando BL (25.0 %), mientras que en embriones congelados, el porcentaje de eclosionados fue de 28.6 % con EB y 20.0 % con BL, demostrando que la vitrificación fue más eficiente que la congelación de embriones fecundados *in vitro* de la especie bovina.

#### 6.2.2. Método de criopreservación por componente racial

En el Cuadro 2, se puede observar la tasa de desarrollo *in vitro* de embriones criopreservados por componente racial, de ganado puro LT comparado con embriones de vacas F1 (LT x Tarentaise). Los embriones producto de vacas F1 (TA) obtuvieron una mayor tasa de desarrollo *in vitro*, comparada con el grupo de embriones de vacas LT ( $6.36 \pm 0.27$  F1 y  $4.00 \pm 0.43$  LT,  $P < 0.05$ ), esta respuesta indica una mayor criotolerancia de los embriones F1 a los métodos de criopreservación empleados. En cuanto al desarrollo embrionario en relación al genotipo, estos resultados son similares a los publicados por de Armas *et al.* (1994), quienes emplearon genotipos Holstein (*Bos taurus*), Cebú (*Bos indicus*) y F1 (Holstein x Cebú) determinando que el componente racial F1 es la fuente más eficiente de ovocitos para la producción de embriones capaces de alcanzar etapas de mórulas y blastocistos (76/250;  $P < 0.001$ ), esto puede ser

atribuido al vigor híbrido obtenido al realizar la cruce de razas de diferente genotipo, por lo que garantizan una mayor tasa de gestación si son empleados en programas de transferencia de embriones.

Sin embargo, Boediono y Suzuki (1996), mencionan que tanto la tasa de producción como el desarrollo de blastocistos bovinos cultivados *in vitro* difieren de raza a raza. Estos autores encontraron una diferencia significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) comparando embriones de vacas de la raza Holstein (*Bos taurus*) con embriones de vacas de la raza Negro Japonés (*Bos taurus*) (252/956, 26.4% vs 184/899, 20%), obteniendo una mayor tasa de desarrollo en la raza Holstein.

En otro trabajo, Boediono *et al.* (2003), compararon la tasa de producción y el desarrollo *in vitro* de blastocistos de raza pura (Negro Japonés) con blastocistos híbridos (Holstein x Negro Japonés) en donde la tasa de producción de blastocistos fue mayor ( $P < 0.05$ ) en los híbridos que en los embriones de raza pura (27% y 20%, respectivamente). Los blastocistos producidos a partir de embriones híbridos se desarrollaron a un ritmo más rápido que los blastocistos producidos a partir de embriones de raza pura. En específico, reportan que en los embriones híbridos, el desarrollo de blastocistos fue significativamente mayor en el día 7 (56%), disminuyó gradualmente al 20% en el día 8 y al 17% en el día 9. En contraste, la tasa de producción de blastocistos a partir de los embriones de raza pura fue menor en el día 7 (17%), el aumento en el día 8 al 59% y luego disminuyó en el día 9 al 24%.

## **7. CONCLUSIONES**

No se encontraron diferencias significativas en la respuesta a los protocolos con o sin eCG, por lo que no es necesaria la inclusión de esta hormona en la superovulación de ganado LT y TA. No se encontraron diferencias significativas entre los métodos de criopreservación empleados, sin embargo, la vitrificación, permitió una mayor tasa (%) de sobrevivencia y desarrollo *in vitro* comparada con la congelación lenta. Los embriones de ganado TA obtuvieron una mayor tasa de desarrollo *in vitro* comparado con los embriones de ganado puro LT, demostrando una mayor criotolerancia a los métodos de criopreservación empleados.

## **8. RECOMENDACIONES**

Es necesario llevar a cabo un programa de superovulación y transferencia de embriones de la raza LT, con la finalidad de comparar la tasa de gestación con la tasa de desarrollo *in vitro* obtenida en esta investigación, permitiendo emplear la información obtenida de estas biotecnologías como una alternativa de conservación y difusión de la raza sin que afecte el hato núcleo de ganado puro.

## **9. LITERATURA CITADA**

Acker J., P., and L. McGann E. 2003. Protective effect of intracellular ice during freezing? *Cryobiology* 46: 197-202.

- Aké L. J. R., Alfaro G. M. E. y L Holy. 1995. Respuesta superovulatoria en ganado *Bos indicus* y *Bos taurus* bajo condiciones tropicales, y efecto del desarrollo y calidad del embrión sobre el porcentaje de gestación. *Veterinaria México*. 26: 189-193.
- Akhoondi M., H. Oldenhof., C. Stoll., H. Sieme., and W. Wolkers F. 2011. Membrane hydraulic permeability changes during cooling of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1808: 642-648.
- Ávila-Portillo., L., M., J. Madero I., C. López., M. F., León., L. Acosta., C. Gómez., L. G., Delgado., C. Gómez., J. M., Lozano., y M. Reguero T. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* 57: 291-300.
- Báez C., F., J., J. A., Landinez A., H. J., Hernández F., y P. C. Villamediana M. 2010. Evaluación del desarrollo embrionario de ovocitos bovinos madurados y fecundados *in vitro* obtenidos a partir de hembras mestizas. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 27: 460-478.
- Barati F., Niasari-Naslaji A., Bolourchi M., Sarhaddi F., Razavi K., Naghzali E. and W. W. Thatcher. 2006. Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer. *Theriogenology*, 66: 1149-1155.
- Bo A. G. and R. Mapletoft J. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction* 10: 344-348.
- Boediono A. and Suzuki T. 1996. *In vitro* development of Holstein and Japanese Black Breeds embryo. *Media Veteriner* 3:1-13.
- Boediono A., Suzuki T. and R. A. Godke. 2003. Comparison of hybrid and purebred *in vitro*-derived cattle embryos during *in vitro* culture. *Animal Reproduction Science*. 78:1-11.
- Bono G., Gabail G., Silvestrelli L. and A. Camin. 1991. Superovulatory and endocrinological responses Simmental cows treated either with PMSG or hMG or in combination. *Theriogenology* 35: 1179-1190.

- Bosch P., M. Blanch S., S. Ferrero., H. Díaz., F. Piccato., y R. Bosch A. 2006. Desarrollo de embriones caprinos *in vitro*: efecto del co-cultivo con células epiteliales de oviducto. Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias (LUZ) 16: 273-281.
- Bülbül B., Kirbas M., Köse M. and S. Dursun. 2010. Investigation of superovulation responses in Brown Swiss cows after synchronization using progesterone and oestradiol valerate. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi. 16: 463-468.
- Bülbül B., Kirbas M., Dursun S. and M. Köse. 2013. Superovulation in cows synchronized with two different progesterone+oestradiol protocols. Archiv Tierzucht 56. 15:160-168.
- Cabrera P., y A. Fernández. 2006. Criopreservación de embriones: Una herramienta básica en la reproducción asistida. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela 47: 59-69.
- Camus A., P. Clairaz., A. Ersham., A. L. Van Kappel., G. Savic., and C. Staub. 2006. Principe de la vitrification: cinétiques comparatives the comparison of the process of five different vitrification devices. Gynécologie Obstétrique and Fertilité 34: 737-745.
- Canales A. M., P. Cervantes., A. Hernández., A. Martínez., V. Landi., J. V. Delgado., B. A. López., B. Domínguez., A. Olmos., y M. Valdés. 2014. Caracterización genética de vacas de la raza Criollo Lechero Tropical en Veracruz, México. Actas Iberoamericanas de Conservación Animal (AICA) 4: 74-76.
- Canseco R. S., Gwazdauskas F. C., Toole R. J., Rajamahendran R., Whittier W. D., and E. Vinson, W. 1992. A retrospective study on the effects of FHS and prostaglandin on superovulation response in dairy cattle. Virginia Journal of. Science. 43:325-332.
- Casas E. y A. Tewolde. 2001. Evaluación de características relacionadas con la eficiencia reproductiva de genotipos Criollos Lecheros en el Trópico Húmedo. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 9: 63-67.



- CONARGEN. 2015. Recursos Criollos. Consejo Nacional de Recursos Genéticos Pecuarios. En: <http://www.conargen.mx/index.php/asociaciones/recursos-criollos> Consultado en noviembre de 2015.
- Conde P. A. 2014. Enfoques integrados de investigación, innovación y extensión en ciencia animal. *Revista de Ciencia Animal* 7: 7-10.
- Courbière B., A. Baudot., C. Mazoyer., B. Salle., and J. Lornage. 2009. La vitrification: technique d'avenir pour la cryoconservation ovarienne? Bases physiques de cryobiologie, avantages et limites. *Gynécologie Obstétrique and Fertilité* 37: 803-813.
- Da Silva A. 2014. El plan de acción mundial de la FAO sobre los recursos zoogenéticos y su aplicación en Latinoamérica y el Caribe. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 48:35-41.
- Dessolle L., V. de Larouzière., C. Ravel., I. Berthaut., J. M. Antoine., and J. Mandelbaum. 2009. Congélation lente et vitrification des ovocytes humains matures et immatures. *Gynécologie Obstétrique and Fertilité* 37: 712-719.
- De Alba J. 2011. El libro de los bovinos criollo de América. Biblioteca básica de agricultura. Ed. Colegio de Postgraduados. México. 444p.
- De Armas R., Solano R., Riego E., Pupo C. A., Aguilar A., Ramos B., Aguirre A., de la Fuente J. and F. Castro O. 1994. Use of F1 progeny of HolsteinxZebu cross cattle as oocyte donors for *in vitro* embryo production and gene microinjection. *Theriogenology* 42: 977-985.
- De Souza D. K., L. Salles P., and A. A. Rosa e Silva M. 2015. Aspects of energetic substrate metabolism of *in vitro* and *in vivo* bovine embryos. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 48: 191-197.
- Do V. H., S. Walton., and A. W. Taylor-Robinson. 2014. Benefits and constraints of vitrification technologies for cryopreservation of bovine *in vitro* fertilized embryos. *Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry* 1: 1-5.

- Dobrinsky R. J. 2002. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology* 57:285-302.
- Dong-Soo S., Chang-Yong C., Sang-Rae C., Sun-Ho C., Hyun-Jong K., and Ill-Hwa, K. 2007. The effect of reduced dose and number of treatments of FSH on superovulatory response in CIDR-treated Korean native cows. *Journal of Reproduction and Development*. 53:1299-1303.
- FAO. 2007. Plan de acción mundial sobre los recursos zoogenéticos y la declaración de Interlaken. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Suiza. pp. 3-5.
- FAO. 2011. Protocolo de Nagoya sobre acceso a los recursos genéticos y participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de su utilización al convenio sobre la diversidad biológica. Secretaría del convenio sobre la diversidad biológica.
- FAO. 2012. Cryoconservation of animal genetic resources. *FAO Animal Production and Health Guidelines* 12:85.
- FAO. 2015. La biodiversidad para el mantenimiento de los agroecosistemas. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. pp. 2.
- Fernández A., T. Díaz., y G. Muñoz. 2007. Producción *in vitro* de embriones bovinos. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Central de Venezuela* 48: 51-60.
- Fernández R. F., J. E. Hernández P., y G. Castellanos G. 2012. Viabilidad de ovocitos porcinos inmaduros y madurados *in vitro* vitrificados con etilén glicol y trehalosa. *Revista de Salud Animal* 34: 46-52.
- Fernández R. F., J. E. Hernández P., J. G. Romero R., y J. L. Rodríguez S. 2013. Viabilidad después de la vitrificación de embriones de cerda y oveja producidos *in vitro*. *Revista de Salud Animal* 35: 52-58.
- Fuller J. B. 2004. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters* 25: 375-388.

- García E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Kôppen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 191p.
- García P. E., J. A. Villanueva J., J. Vilaboa A., y G. López R. 2010. Evolución del concepto de agroecosistema. *In: Memoria del simposio de agroecosistemas y territorialidad. XXIII Reunión científica-tecnológica forestal y agropecuaria Veracruz y II del trópico Mexicano.* Ruíz R. O., M. C. Álvarez D. J. L. Reta M. (Comps.). Colegio de Postgraduados Campus Veracruz. Veracruz, México. pp: 7.
- Giraldo G. J. J., S. Ordóñez R., y A. Álvarez A. 2012. La vitrificación como alternativa de conservación de embriones producidos *in vitro*. *Journal of Agriculture and Animal Sciences* 1: 38-51.
- González B. A. 2007. Avances en transferencia de embriones en pequeños rumiantes. *Acta Scientiae Veterinariae.* 35: 773-780.
- González-Cerón F., C. M. Becerril-Pérez. G. Torres-Hernández y P. Díaz Rivera. 2009. Garrapatas que infestan regiones corporales del bovino Criollo Lechero Tropical en Veracruz, México. *Agrociencia* 43: 11-19.
- Guerra R., A. Solis., G. Sandoya., y R. de Armas. 2012. Evaluación de tres protocolos de criopreservación de embriones bovinos obtenidos *in vivo* e *in vitro*. *Revista Electrónica de Veterinaria* 13: 1-16.
- Hart D. R. 1985. Conceptos básicos sobre agroecosistemas. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza. Turrialba, Costa Rica. pp. 1-10.
- Hernández A. F. 2005. El manejo integrado en el control de garrapatas. *In: Manual de ganadería doble propósito.* Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de Zulia. pp. 384-391.
- Holovati L. J., C. Maria I., Gyongyossy-Issa., y J. Acker P. 2009. Effects of trehalose-loaded liposomes on red blood cell response to freezing and post-thaw membrane quality. *Cryobiology* 58: 75-83.

- Kaidi S., Bernard S., Lambert P., Massip A., Dessy F. and I. Donnay. 2001. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 65:1127-1134.
- Lascuráin M., R. List., L. Barraza., E. Díaz P., F. Gual S., M Maunder., J. Dorantes y V. E. Luna. 2009. Conservación de especies *ex situ*. *In: Capital natural de México. Estado de conservación y tendencias de cambio*. CONABIO, México. pp. 517-554.
- Lermen D., B. Blömeke., R. Browne., A. Clarke., P. W. Dyce., T. Fixemer., G. Fuhr R., W. Holt V., K. Jewgenow., R. Lloyd E., S. Lötters., M. Paulus., G. Mcgregor R., D. H. Rapoport., D. Rawson., J. Ringleb., O. Ryder A., G. Spörl., T. Schmitt., M. Veith., and P. Müller. 2009. Cryobanking of viable biomaterials: implementation of new strategies for conservation purposes. *Molecular Ecology* 18: 1030-1033.
- Leroy G., C. Danchin-Burge. And E. Verrier. 2011. Impact of de use of cryobank samples in a selected cattle breed: a simulation study. *Genetic Selection Evolution* 43:36.
- Lopes da Costa L., Chagas e Silva J. and Silva J. R. 2001. Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology*. 56:65-77.
- Lozano D. R. R., Asprón P. M. A., Vásquez P. C. G., González P. E. y Aréchiga, F. C. F. 2010. Efecto del estrés calórico sobre la producción embrionaria en vacas superovuladas y la tasa de gestación en receptoras. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 1:189-203.
- Liu J., J. Phy., y E. Yeomans. 2012. Theoretic considerations regarding slow cooling and vitrification during cryopreservation. *Theriogenology* 78:1641-1652.
- Mara L., S. Casu., A. Carta., y M. Dattena. 2013. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Animal Reproduction Science* 138: 25-38.

- Martínez A. G., y A. Valcárcel. 2008. Vitrificación de embriones producidos *in vitro*. Reproducción 23: 21-33.
- Martínez D. J. P., F. Gallardo L., L. C. Bustillo G., y A. Pérez V. 2011. El agroecosistema, unidad de estudio y transformación de la diversidad agrícola en Veracruz. *In: La diversidad en Veracruz estudio de estado*. México. pp. 453-462.
- Meza-Nieto M. A., A. F. González-Córdoba., C. M. Becerril-Pérez., F. J. Ruiz-López., P. Díaz-Rivera y B. Vallejo-Córdoba. 2010. Polimorfismo genético de la  $\beta$ -Lactoglobulina en la leche de vacas Holstein y Criollo Lechero Tropical. *Agrociencia* 44: 531-539.
- Miceikiene I., N. Krasnapiorova., y R. Petraškienė. 2003. *Ex-situ* and *in-situ* conservation of Lithuanian domestic animal genetic resources – lessons from past and future perspectives. *In: Farm animal reproduction: Conserving local genetic resources, proceedings from a minisymposium at Lithuanian Veterinary Academy*. Bage R., and Januskaukas (eds.) Kaunas, Lithuania. 2003. Uppsala. pp. 9-12.
- Motta D. P. A., Ramirez Y. N. M., Ramos C. N., Valencia H. A. F. y Perdomo T. W. 2011. Respuesta superovulatoria en número y calidad embrionaria de vacas y novillas Gyr lechero en clima cálido húmedo. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 12:1-14.
- Mucci N., J. F. Aller., G. G. Kaiser., F. Hozbor., y R. H. Alberio. 2006a. Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de Medicina Veterinaria* 38: 97-104.
- Mucci N., J. Aller., G. G. Kaiser., F. Hozbor., J. Cabodevila., y R. H. Alberio. 2006b. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 65: 1551-1562.
- Nahed T. J. 2002. Animales domésticos y agroecosistemas campesinos. *Revista de Agroecología LEISA* 18:10-11.

- Nedambale T. L., A. Dinnyés., W. Groen., J. R. Dobrinsky., X. C. Tian., and X Yang. 2004. Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 62: 437-449.
- Nilchuen P., Rattanatabtimtong S. and Chomchai S. 2011. Superovulation with different doses of follicle stimulating hormone in Kamphaeng Saen beef cattle. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 33:679-683.
- Nilchuen P., Rattanatabtimtong S. and Chomchai, S. 2012. Superovulation with different doses of follicle stimulating hormone in Kamphaeng Saen beef cattle. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 11:676-680.
- Papadopoulos S., D. Rizos., P. Duffy., M. Wade., y K. Quinn. 2002. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts. *Animal Reproduction Science* 74: 35-44.
- Paula-López F. F., Lima S. R., Satrapa A. R. and C. M Barros. Physiology and endocrinology symposium: influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs *Bos taurus*) on oocyte and preimplantation embryo resistance to increased temperatura. *Journal Animal Science* 91: 1143-1153.
- Pegg E. D. 2015. Principles of cryopreservation. *In: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Methods in Molecular Biology*. Wolkers W. F., and Oldenhof H. Hatfield, Hertfordshire, UK. Third edition. pp: 3-19.
- Pereira R. M. and C. C. Marques. 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Banking* 9: 267-277.
- Pereira J. A. C., H. M. Carino., R. Hoyos., A. Rogberg-Muñoz., A. Loza., P. J. Lirón., T. Mamani., V. M. Ripoli., y G. Giovambattista. 2012. Diseño de un programa de conservación de un hato de criollo Yacumeño asistido por marcadores genéticos en Santa Cruz – Bolivia. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal (AICA)* 2: 155-159.

- Pérez J. J. y R. Razz. 2009. La teoría general de los sistemas y su aplicación en el estudio de la seguridad agroalimentaria. *Revista de Ciencias Sociales*. 15:486-498.
- Prickett C. R., L. A. Marquez-Curtis., J. A. W. Elliot., and L. E. McGann. 2015. Effect of supercooling and cell volume on intracellular ice formation. *Cryobiology* 70: 156-163.
- Quan G. B., Y. Han., X. M. Liu., and F. Gao. 2009. Effects of pre-freeze incubation of human red blood cells with various sugars on postthaw recovery when using a dextran-rapid cooling protocol. *Cryobiology* 59: 258–267.
- Rafagnin M. L. S., Ohlweiler L. U., Barreta M. H., Dias G. P. B., Mezzalira J. C. y A. Mezzalira. 2015. Efeito do método de criopreservação utilizado, estágio de desenvolvimento embrionário e uso de isômeros do ácido linoleico conjugado na criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*. *Ciências Agrárias, Londrina*, 36: 4297-4310.
- Rizos D., Gutierrez-Adan A., Pérez-Garnelo S., de la Fuente J., Boland P. M. and Lonergan P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and Messenger RNA expression. *Biology of Reproduction* 68: 236-243.
- Roa N., Denis R., Domínguez A., D'Enjoy D. y C. Marín. 2013. Creación de banco de germoplasma vacuno (embriones) de razas autóctonas Criollo Limonero y Siboney existentes en Venezuela. *Mundo Pecuário*. 9:129-135.
- Rodríguez P., y C. Jiménez. 2011. Criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Revista de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* 58: 107-119.
- Rosendo-Ponce A., y C. M. Becerril-Pérez. 2015. Avance en el conocimiento del bovino Criollo Lechero Tropical de México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 2: 233-243.
- Rosales M. F., Rosendo P. A., Canseco S. R., Cortez R. C., Torres H. G. y C. M. Becerril P. 2013. Superovulación en ganado Criollo Lechero Tropical. Resumen de

- memorias del noveno seminario internacional de producción de ovinos en el trópico y de la XL reunión asociación mexicana para la producción animal y seguridad alimentaria A. C. Villahermosa, Tabasco. México. 24 de marzo de 2013. pp. 701-703.
- Ruíz R. y L. M. Oregui. 2001. El enfoque sistémico en el análisis de la producción animal. *Investigación agrícola: Producción y Sanidad Animal*. 16:29-61.
- SAGARPA. 2014. Informe sobre la Situación de los Recursos Genéticos Pecuarios en México. En <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Paginas/InfoRGP> Consultado en noviembre de 2015.
- Salgado O. R., Mejía A. A. y Suárez P. S. 2011. Eficiencia de la respuesta superovulatoria del ganado Brahman al protocolo P-24. *Revista MVZ Córdoba*. 16:2521-2527.
- Santellano-Estrada E., Becerril-Pérez C. M., Mei-Chang Y., Gianola D., Torres-Hernández G., Ramírez-Valverde R., Domínguez-Vivieros J., y A. Rosendo-Ponce. 2011. Caracterización de la lactancia y evaluación genética del ganado Criollo Lechero Tropical utilizando un modelo de regresión aleatoria. *Agrociencia* 45: 165-175.
- Saravia A. 1985. Un enfoque de sistemas para el desarrollo agrícola. Sagone M. A. y J. Escoto B. (eds). Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 265 p.
- SAS Institute. 2015. SAS 9.4 para windows. SAS Inst. Inc., Cary, NC. USA.
- Sawicka D., J. Brzezinska., y M. Bednarczyk. 2011. Cryoconservation of embryonic cells an gametes as a poultry biodiversity preservation method. *Folia Biológica (Kraków)* 59: 1-5.
- Schiewe M. C., Looney C. R., Johnson C. A., Hill K. G. and Godke R. A. 1987. Transferable embryo recovery rates following different insemination schedules in superovulated beef cattle. *Theriogenology*. 28:395-406.
- Seidel G. E. Jr. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* 65: 228–235.



- Serrano N. C. A., R. Sierra., J. E. Sánchez., L. F. Restrepo., y M. Olivera A. 2002. Evaluación de dos métodos de criopreservación sobre la calidad de embriones producidos *in vitro*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 15: 1-7.
- Shaluei F., M. R. Imanpoor., A. Shabani., and M. H. Nasr-Esfahani. 2013. Effect of different concentrations of permeable and non-permeable cryoprotectants on the hatching rate of goldfish (*Carassius auratus*) embryos. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 2: 185-188.
- Sharma D. K., and T. Sharma. 2013. Biotechnological approaches for biodiversity conservation. *Indian Journal of Scientific Research* 4: 183-186.
- Stolzing A., Y. Naaldijk., V. Fedorova. And S. Sethe. 2012. Hydroxyethylstarch in cryopreservation – Mechanisms, benefits and problems. *Transfusion and Apheresis Science* 46: 137-147.
- Suárez D. H. 2008. Factores que afectan la eficiencia productiva del sistema doble propósito en los trópicos mexicanos. *In: Desarrollo sostenible de ganadería doble propósito*. pp. 70-82.
- Sugano M. and Watanabe S. 1997. Use of Highly purified porcine FSH preparation for superovulation in Japanese Black cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*. 59:223-225.
- Tewelde A. 2007. Los Criollos bovinos y los sistemas de producción animal en los trópicos de América Latina. APPA-ALPA. pp. 13-19.
- Vaamonde D., R. Suárez S., A. Ahumada., C. Duarte., C. Torres., and S. Oehninger. 2010. Primer informe en Uruguay de la vitrificación de embriones como alternativa real a la técnica de congelación lenta. *Revista Médica del Uruguay* 26: 178-186.
- Vajta G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science* 60-61: 357-364.
- Vajta G. and M. Kuwayama. 2006. Improving criopreservation System. *Theriogenology* 65: 236-244.

- Vanderzwalmen P., N. Zech., A. J. Greindl., F. Ectors., and B. Lejeune. 2006. Cryopréservation des embryons humains par vitrification. *Gynécologie Obstétrique and Fertilité* 34:760-769.
- Vásquez E. M., S. Cueva M., A. Cordero R., M. L. Gonzales C., and W. Huanca L. 2011. Evaluación de dos métodos de criopreservación de embriones de llamas sobre las tasas de supervivencia *in vivo* e *in vitro*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 22:190-198.
- Velásquez M. D. 2010. La función de la biodiversidad para la existencia de agua en el ecosistema y en el agroecosistema. *Revista de Agroecología LEISA*. pp. 32-35
- Vélez M. M. y L. F. Uribe V. 2010. ¿Cómo afecta el estrés calórico la reproducción? *Biosalud* 9: 83-95.
- Vilaboa A. J., P. Díaz R., O. Ruiz R., D. E. Platas R., S. González M., y F. Juárez L. 2009. Caracterización socio-económica y tecnológica de los agroecosistemas con bovinos de doble propósito de la región del Papaloapan, Veracruz, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10: 53-62.
- Vilaboa A. J., O. J. Quiroz M., P. Díaz R., y P. Zetina C. 2012. Situación del Criollo Lechero Tropical (CLT) en México, Nicaragua y Costa Rica. *Archivos de Zootecnia* 61: 31-39.
- Vilaboa A. J. 2013. La ganadería doble propósito desde una visión agroecosistémica. *Agroproductividad* 6: 11-17.
- Walker J. D., Campos-Chillon L. F. and Seidel G. E. 2006. Vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos by addition of ethylene glycol in one-step. *Reproduction in Domestic Animals* 41: 467-471.
- Woods J. E., J. D. Benson., Y. Agca., and J. K. Critser. 2004. *Fundamental Cryobiology of reproductive cells and tissues*. *Cryobiology* 48: 146-156.