



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS

AGRÍCOLAS

CAMPUS VERACRUZ

POSTGRADO EN AGROECOSISTEMAS TROPICALES

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES DEL GANADO

CRIOLLO LECHERO TROPICAL

FERNANDO NARANJO CHACÓN

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

TEPETATES, MANLIO FABIO ALTAMIRANO, VERACRUZ.

2014

La presente tesis, titulada: **Transferencia de embriones del ganado Criollo Lechero Tropical**, realizada por el alumno: **Fernando Naranjo Chacón**, 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: _____

Dra. ALEJANDRA SOTO ESTRADA

ASESOR: _____

Dr. RODOLFO CANSECO SEDANO

ASESOR: _____

Dr. CARLOS MIGUEL BECERRIL PÉREZ

Tepetates, Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, Julio 2014

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES DEL GANADO CRIOLLO LECHERO TROPICAL

Fernando Naranjo Chacón, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014

La transferencia de embriones es una biotecnología para la mejora genética y la conservación de especies y razas bovinas en peligro de extinción. La raza bovina Criollo Lechero Tropical de México (CLT) está adaptada a los climas cálidos y tiene un programa de mejora genética, pero se desconoce el mejor método para la criopreservación de sus embriones. El objetivo de este estudio fue comparar dos métodos de criopreservación por curva lenta y vitrificación de embriones CLT, mediante la transferencia a vacas receptoras CLT puras y mestizas. El estudio se realizó en el Colegio de Posgraduados (CP) y en Olinalá Guerrero (OG). Los tratamientos se asignaron aleatoriamente a las receptoras de ambos genotipos, seis embriones para CLT y cuatro para mestizas por curva lenta, cinco en receptoras CLT y cinco en mestizas por vitrificación para CP, para OG cuatro embriones por curva lenta en receptoras CLT y cinco con mestizas, para embriones vitrificados seis en receptoras CLT y cinco en mestizas. Se realizó la prueba de ji-cuadrada para analizar los datos. No se encontró efecto del método de criopreservación en el porcentaje de gestación ($p > 0.05$) y se obtuvieron 10 % (1/10) y 20 % (2/10) para CP y 11 % (1/9) y 27 % (3/11) en OG de gestación para curva lenta y vitrificación. Se requiere de otros estudios para determinar los factores que afectan el éxito de la transferencia de embriones CLT en vacas receptoras.

Palabras clave: Embriones, Criollo, Curva Lenta, Vitrificación.

EMBRYO TRANSFER OF THE TROPICAL MILKING CRIOLLO CATTLE

Fernando Naranjo Chacón, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014

Embryo transfer is a biotechnology for the genetic improvement and conservation of livestock species and breeds in danger of extinction. The Tropical Milking Criollo (CLT) cattle breed in Mexico is adapted to warm climates and has a genetic improvement program, but the best method for the cryopreservation of embryos is unknown. The objective of this study was to compare two methods of CLT embryo cryopreservation, slow freezing and vitrification, prior to transfer to pure and crossbred recipient CLT cows from Colegio de Postgraduados (CP) and Olinalá Guerrero (OG), the two study sites. Treatments were randomly assigned to the receiving females of both genotypes. Six purebred and four crossbred embryos were assigned to slow freezing. Five crossbred and five purebred embryos were assigned to vitrification for CP, while four purebred OG and five crossbred embryos were assigned to slow freezing; for vitrified embryos, six were assigned to purebreds and five to crossbreds. A chi-square was used to analyze the data. No effect was found from cryopreservation method on pregnancy rate ($p>0.05$); 10 % and 20 % for CP and 11 % and 27 % for OG were obtained for slow freezing and vitrification, respectively. Further studies are required to determine the factors affecting the success of embryo transfer in recipient CLT cows.

Keywords: Embryos, Criollo, Slow Freezing, Vitrification.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por permitirme concluir una meta más en mi vida, por estar siempre en los momentos difíciles y no abandonarme.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por la beca otorgada para la manutención durante estos estudios de maestría.

Al **Colegio de Postgraduados Campus Veracruz** por permitirme realizar mis estudios de maestría en ciencias, además, por el financiamiento a proyectos de investigación de tesis 2012 y al proyecto del ganado Criollo Lechero Tropical por su apoyo.

Al **Dr. Adalberto Rosendo Ponce**, por ser mi consejero, brindarme su amistad y permitirme trabajar con el proyecto de ganado Criollo Lechero Tropical, además, por el entusiasmo brindado para realizar un buen trabajo de investigación.

Al **Dr. Carlos Miguel Becerril Pérez**, por sus consejos, apoyo, dedicación y las interminables sugerencias en todo el estudio de maestría, para obtener un resultado de nivel, lo cual ha influenciado directamente en mi formación.

Al **Dr. Rodolfo Canseco Sedano**, por brindarme su amistad y sus invaluable participaciones en las fases de campo que se realizaron en este proyecto, las múltiples visitas para aclaraciones y sugerencias para el manejo de las receptoras, así como participar en sus proyectos particulares.

A la **Dra. Alejandra Soto Estrada** por su importante participación en mi formación académica, su apoyo y sugerencias durante mis estudios de posgrado y sus correcciones acertadas en la redacción de la tesis.

Al **M.C. Oscar Enrique Zarate**, por su gran participación en el proceso y fases de campo que tuvo esta investigación.

A **Blanca Castellanos P.**, por tu cariño y compañía estos años de estudio y por estar siempre presente en cada proceso de mi investigación. TQM

A mis compañeros y amigos, **Ernesto, Jesús, Rosi, Chucho**, don **Andrés** y **Froylán** por brindarme su amistad y apoyo, además que siempre estuvieron dispuestos a apoyarme durante la fase experimental.

A toda la familia **Rosendo Ponce** de la comunidad de Xixila Guerrero, por su amistad, amabilidad y cariño durante mi estancia en la fase de campo.

A los amigos del rancho por su apoyo y amistad.

DEDICO ESTA TESIS A:

Mi Madre **Constanza Chacón Medina**

Por tanto amor y cariño que me brindas día con día, tus consejos, regaños, alegrías, tristezas que hemos pasado, por los valores que me has inculcado a lo largo de mi formación para ser un hombre de bien, por tu gran apoyo para poder concluir esta etapa de mi vida te dedico esta tesis. Te amo MAA.

Mis abuelos **Arnoldo Chacón Cruz †** y **Maura Medina Abad †**

Aunque ya tienen mucho tiempo de no estar con nosotros, siempre nos cuidan y protegen desde donde estén y sé que les hubiera gustado ver los logros que he obtenido. Los quiero y extraño.

Mi tía **Lucí** y sobrina **Frida Chacon Medina**

Por todo su cariño y apoyo que me han brindado en cada faceta de mi vida las quiero y esto también es parte de ustedes.

*Mi Hermana **Araceli Chacón** y **Justo Omar**, mis sobrinos **Omar** y **Michelle** porque con ellos he vivido momentos inolvidables además de estar siempre presentes en mi vida.*

*Mis tíos **Arnoldo** y **Zenón Chacón Medina** por su apoyo incondicional y estar siempre pendiente en cada proceso de mi formación.*

CONTENIDO

	pagina
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Justificación.....	3
2.2. El ganado Criollo Lechero Tropical.....	5
2.3. Transferencia de embriones.....	6
2.4. Etapas de la transferencia de embriones.....	8
2.5. Protocolos para sincronizar el celo en hembras receptoras.....	9
2.5.1. Sincronización del celo con prostaglandina F2 α (PGF).....	9
2.5.2. Sincronización del celo con hormona liberadora de Gonadotropina (GnRH) y PGF2 α , protocolo Ovsynch.....	10
2.5.3. Sincronización con progesterona.....	10
2.6. Criopreservación de embriones.....	11
2.6.1. Método de vitrificación.....	12
2.6.2. Método convencional o curva lenta.....	13
2.7. Transferencia de embriones en ganado bovino.....	14
2.7.1. Efecto del CIDR sobre la tasa de preñez en vacas de carne.....	14
2.7.2. Producción y trasplante de embriones congelados de bovinos Criollo Limonero.....	15
2.7.3. Análisis multifactorial de la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones en Colombia.....	15
2.8. El agroecosistema y la ganadería.....	16
3 OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo general.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4 HIPÓTESIS	20
4.1. Hipótesis general.....	20
4.2. Hipótesis específicas.....	20
5 MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1. Localización de las áreas de estudio.....	21
5.2. Manejo de hembras receptoras.....	21
5.3. Alimentación de las receptoras.....	23
5.4. Selección de Embriones transferibles.....	24
5.5. Protocolo de sincronización del celo.....	24
5.6. Proceso de Transferencia de Embriones.....	25

5.7. Análisis estadístico.....	27
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
7 CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS.....	37
8 CONCLUSIONES.....	38
9 LITERATURA CITADA.....	39
ANEXOS.....	49

LISTA DE CUADROS

	página
Cuadro 1. Principales países importadores de leche (miles de toneladas)....	4

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1. Modelo de agroecosistema bovino.....	19
Figura 2. Protocolo de sincronización de celo para receptoras.....	25
Figura 3. Porcentaje de gestación con embriones CLT por vitrificación (■) y por curva lenta (■), con el genotipo de la receptora CLT: Criollo Lechero Tropical y mestizas en CP.....	29
Figura 4. Porcentaje de gestación con embriones CLT por vitrificación (■) y por curva lenta (■), con el genotipo de la receptora CLT: Criollo Lechero Tropical y mestizas en OG.....	30
Figura 5. Porcentaje de la clasificación de cuerpos lúteos calidad tres (■), dos (■) y uno (■) en el genotipo CLT: Criollo Lechero Tropical y mestizas en CP.....	34
Figura 6. Porcentaje de la clasificación de cuerpos lúteos calidad tres (■), dos (■) y uno (■) en el genotipo CLT: Criollo Lechero Tropical y mestizas en OG.....	34

1. INTRODUCCIÓN

A partir de la década de los ochenta del siglo XX, la biotecnología para mejorar la reproducción del ganado bovino ha cambiado de manera acelerada. Esta biotecnología reproductiva se caracterizó por el desarrollo de técnicas de Inseminación Artificial (IA) y Transferencia de Embriones (TE), que han contribuido a incrementar de forma rápida la capacidad reproductiva y la mejora genética del ganado bovino (Romo, 1993).

Los programas de mejoramiento genético, persiguen obtener un mayor número de descendientes de las progenitoras genéticamente superiores, por lo cual, la implementación de la TE contribuye a este fin, además de reducir problemas reproductivos y sanitarios (Martínez, 2008).

La TE fue establecida en la década de los setenta del siglo XX, inicialmente de manera quirúrgica. Desde la década de los ochenta hasta la fecha, la mayoría de los embriones se transfieren mediante la técnica no quirúrgica (Jones *et al.*, 2008). La transferencia se realizaba en sus primeras etapas con embriones producidos *in vivo*, posteriormente apareció la fecundación *in vitro* (FIV) y por último, la Transferencia de Núcleos (TN) y transgénesis (Betteridge, 1997).

La criopreservación por medio de la congelación, permite preservar embriones que son recolectados de hembras donadoras teniendo como ventaja la ejecución de programas de TE mediante métodos no quirúrgicos en diferentes tiempos, según se requiera. El convencional y la vitrificación son los métodos más utilizados para criopreservar embriones. El primero es por congelación lenta mediante un equipo programable y es

útil para preservar embriones bovinos producidos *in vivo* (Lindner y Wright, 1983 Cabodevil y Teruel, 2001;). La vitrificación es un proceso físico de solidificación para conservar órganos, tejidos y más recientemente embriones incorporando crioprotectores en alta concentración; el embrión al ser sumergido en nitrógeno líquido, pasa del estado líquido al sólido como un vidrio (Fahy *et al*, 1984; Rall y Fahy, 1985).

La congelación de embriones en el momento de la recolección tiene como ventajas disponer de material genético durante más tiempo sin afectar su viabilidad, trasladar los embriones a distancias largas y disminuir el riesgo de introducción de enfermedades, entre otras (Rall, 1992; Shimohira, 1995).

Los recursos genéticos locales como el ganado Criollo Lechero Tropical (CLT), son importantes ya que representan alternativas para mantener la producción de leche y carne en tierras bajas y climas cálidos del Trópico Americano, ante los cambios climáticos, económicos y sociales. Por ello, es conveniente la introducción de biotecnologías como la TE a estas regiones tropicales cálidas, para conservar, expandir y distribuir de manera eficiente y responsable dichos recursos; de otra manera la introducción de razas no adaptadas provenientes de zonas templadas a zonas cálidas propician que los sistemas de producción de leche y carne no sean sustentables (Lake, 1986). Ante esta situación, el ganado CLT constituye una base biológica para la seguridad alimentaria de las actuales y futuras generaciones.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Justificación

En América Latina, existe una tendencia al aumento de las importaciones de productos lácteos. México, Brasil y Venezuela contabilizan más del 90 % del déficit comercial de lácteos, mientras Argentina y Uruguay tienen superávit. Estados Unidos es exportador de productos lácteos a México, especialmente de insumos como la leche en polvo (SE, 2012).

La producción de leche bovina en México, es insuficiente para satisfacer la demanda interna del producto. El 37 % del Trópico Cálido Mexicano participa en la producción pecuaria (18, 952,300 ha), y sirve de sustento para 12 millones de bovinos que producen 28 y 39 % de la leche y carne que se consume en el país (Koppel *et al.*, 1999).

La producción de 1986 a 1990 fue menor que la demanda y se importó 9.58 % del total requerido. De 1996 al 2001 las importaciones fueron 13.20 % del consumo total (SAGARPA, 2001). Durante 2009, la producción nacional de la leche fue de 10,549 millones de litros, lo cual representó un decremento del 0.38 % con respecto a la producción del 2008. En los últimos 10 años la Taza Media de Crecimiento Anual (TMCA) de producción de leche presentó un incremento de 1.74 % SAGARPA (2010). Así, México fue el principal país importador del mundo, tan solo en el 2001 entraron al país 190,000 ton de leche en polvo y se importaron 171,494 ton de 2006 a 2010; en 2013 se importaron 225,000 ton de leche descremada en polvo (FIRA, 2001; SIAP,

2013). En el Cuadro 1 se presentan los principales países importadores de leche en polvo.

Cuadro 1. Principales países importadores de leche (miles de toneladas)

País / Año	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	TMCA 09-feb	Var. % 10-sep
México	132	129	141	155	113	121	173	180	190	4	5.6
Japón	44	43	37	34	32	36	32	35	30	-2.8	-14.3
Indonesia	110	120	125	135	140	147	159	178	187	6.2	5.1
Filipinas	100	110	120	87	95	98	85	95	n.d.	-0.6	n.a
Fed. Rusa	50	60	65	70	45	50	75	50	60	0	20
china	35	51	61	55	62	40	55	65	70	8	7.7
Taiwán	31	23	17	19	20	20	15	17	n.d.	-7.2	n.a
Argelia	114	81	75	72	68	91	90	91	85	-2.8	-6.6
Korea	4	5	4	6	7	5	5	8	9	9.1	12.5
Suma	620	622	645	633	582	608	689	719	631	1.9	-12.2
Otros países	59	72	55	44	41	24	25	36	44	-6	22.2
Total	679	694	700	677	623	632	714	755	675	1.3	-10.6

TMCA: Taza Media de Crecimiento Anual. Var: variación

Fuente: Dairy: World Markets and Trade. USDA, FAS. December 2009.

Durante el período 2003-2011 la producción nacional de leche de bovino ha tenido una Tasa Media de Crecimiento de 1.3 %. Sin embargo, la producción de lácteos es la tercera actividad más importante del país dentro de la industria de alimentos y su crecimiento dependerá de la disponibilidad de leche a nivel nacional (SE, 2012).

El déficit de producción de leche justifica el uso de biotecnologías reproductivas de última generación como la criopreservación y la TE en el ganado CLT, que tienen entre otras ventajas, contribuir al incremento de la productividad de las poblaciones animales, preservación de razas bovinas en peligro de extinción, reducción del intervalo generacional e incremento de animales genéticamente superiores para la producción de leche en el trópico cálido del país.

2.2. El ganado Criollo Lechero Tropical

El término criollo se refiere a individuos nacidos en el Continente Americano que descienden de progenitores europeos procedentes de la Península Ibérica.

Los ganados criollos, cuya finalidad principal fue la crianza y producción (Martyniuk y Planchenault, 1998), se naturalizaron bajo condiciones adversas de diferentes ambientes de América. Así, el ambiente, el recurso genético y la interacción entre ambos contribuyó a la conformación de bovinos con potencial de sobrevivencia y producción de carne y leche (Pariacote, 2000).

El ganado Criollo Lechero Tropical (CLT) proviene de animales introducidos a México de Nicaragua en la década de los sesenta del siglo XX y de animales locales provenientes de estados de la vertiente del Océano Pacífico. Desde esa fecha ha estado sujeto a un programa de registro de producción y mejora genética del rendimiento lechero (Rosendo, 1998).

El hato se estableció inicialmente en el estado de Tamaulipas en un rancho propiedad de la Asociación Mexicana de Producción Animal (AMPA) con la introducción de 17 vacas procedentes de Nicaragua, dos toros de Costa Rica y posteriormente semen de 13 toros también de Costa Rica. En 1991, el hato se trasladó a Gutiérrez Zamora, Veracruz; nueve años después se estableció el hato núcleo conformado por 63 vacas adultas y cinco toros, en el Campus Veracruz del Colegio de Postgraduados (Díaz *et al.*, 2005).

En la actualidad la Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Romosinuano y Lechero Tropical (AMCROLET A.C.), es responsable de la expedición de certificados individuales de registro de pureza racial, comparación genética entre los hatos, mejoramiento de la raza e inventario (SAGARPA, 2002).

Las vaquillas CLT tuvieron su primer parto a la edad de $1,195 \pm 178$ (Bodisco y Abreu, 1981; de Alba, 1985; de Alba y Kennedy, 1994; Rosendo, 1998). El número de servicios por concepción fue 1.57 y el intervalo entre partos de 390 a 420 d (Carmona y Muñoz, 1966; Pereira *et al.*, 1981; Montiel *et al.*, 1986). Las vacas CLT produjeron 1,738.5 kg de leche en 305 d, con 3.4 ± 0.1 % de proteína, 3.4 ± 0.1 % de grasa y 12.3 ± 0.2 % de sólidos totales, (Ríos, 2014 información personal).

2.3. Transferencia de embriones

La biotecnología de la reproducción animal ha alcanzado un gran auge en el contexto internacional, con el objetivo de mejorar las especies animales para el mercado y preferencias del consumidor. La TE surge con la intención de reproducir una mayor cantidad de animales de alta calidad genética en un menor tiempo (Orellana y Peralta, 2007). Además, se tiene la posibilidad de aprovechar la mayor cantidad de oocitos que existen en los ovarios de una hembra, mediante la aplicación de tratamientos superovulatorios, que lleven a incrementar hasta diez veces la media de ovulación (Martínez, 2008).

La TE ha sufrido grandes cambios en un período corto (Mapletoft *et al.*, 1986; Mapletoft, 1996). Por ejemplo se inició en clínicas sofisticadas con técnicas quirúrgicas para la recolección; no se disponía de productos farmacéuticos que permitieran actuar

efectivamente sobre el ciclo estral de la vaca, ni de la existencia del patrón de crecimiento folicular en ondas que hoy se conoce (Mapletoft, 1996).

Los productores de ganado de leche y carne a nivel mundial, con el propósito de mejorar los hatos para obtener mejores rendimientos y con ello mayor beneficio económico, han optado por implementar la técnica de la TE en sus unidades de producción (Orellana y Peralta, 2007). Incluso, los programa de mejora genética se aceleran, mediante la inducción de partos gemelares, el aumento del número de terneros de las mejores vacas, con la finalidad de exportar animales a diversos países y disminuir problemas de adaptación climática (Phillips, 2003).

Las hembras receptoras constituyen un aspecto muy importante para el éxito de la TE (Bó *et al.*, 1996). Estas pueden ser utilizadas a través de un programa de detección de celos naturales o de celos inducidos mediante tratamientos hormonales. La detección de celos es un factor clave que afecta el costo de manutención de las vacas receptoras, así como el intervalo a la concepción (Bó *et al.*, 1996; Beal y Hinshaw, 2001). Por lo tanto, se deben utilizar protocolos de sincronización de celos de las receptoras para aumentar la eficiencia reproductiva y disminuir el número de visitas del equipo técnico de los programas de TE (Bó *et al.*, 1994; Mapletoft, 1996).

Diversos estudios de TE han analizado que el estrés calórico disminuyen la viabilidad de esta biotecnología (Putney *et al.*, 1989; Wolfenson *et al.*, 2000; Hansen, 2007; Sartori *et al.*, 2010). Hernández *et al.*, (2004) mencionaron que el estrés calórico tiene efectos menos detrimentales en las funciones reproductivas de genotipos adaptados a zonas cálidas, que aquellos provenientes de climas templados. Se estima que más del

50 % de la población bovina mundial se encuentra en la zona intertropical, donde el estrés calórico causa grandes pérdidas económicas en el ganado de leche (Wolfenson *et al.*, 2000; Sartori *et al.*, 2010).

Las vacas bajo estrés calórico incrementan la incidencia de muerte embrionaria (Putney *et al.*, 1988; Ealy *et al.*, 1993; Hernández *et al.*, 2004, Hansen, 2007). En Florida Estados Unidos, vacas Holstein lactantes sometidas a estrés calórico del verano, tuvieron 47.6 % de gestación a los 21 d después de la transferencia, y se redujo a 29.2 % a los 60 d. Los embriones bovinos son sensibles al estrés calórico materno en los primeros 7 d después del estro (Putney *et al.*, 1989).

En ganado de carne, Romosinuano y Brahman, adaptado al trópico cálido y Angus no adaptado, se produjeron embriones *in vitro* con más de ocho células que fueron expuestos a choque térmico de 41 °C, en donde se provocó una disminución en el desarrollo hasta la etapa de blastocito; se mostró que los embriones Angus se desarrollaron menos que los Romosinuano y Brahmán; y embriones sometidos a choque térmico de 38.5 °C, no presentaron diferencia en su desarrollo entre las razas. Las razas adaptadas al trópico cálido presentaron mayor capacidad de termorregulación que favorece a las células ante un choque térmico y beneficia la sobrevivencia de los embriones (Hernández *et al.*, 2004).

2.4. Etapas de la transferencia de embriones

La TE considera desde la selección de hembras donadoras hasta la transferencia del embrión a hembras receptoras. Las etapas son: Inducción de la superovulación (donadora), sincronización del celo (receptoras) mediante protocolos de sincronización,

recolección de los embriones (donadora), clasificación de los embriones, almacenamiento por corto plazo y cultivo, criopreservación, y por último la transferencia de los embriones (receptoras).

En la actualidad muchas otras técnicas relacionadas con la TE, han sido factible como el sexado de embriones, la micromanipulación, la fertilización *in vitro* y la donación, las cuales son utilizadas por las empresas de TE en el mundo (INIFAP-SAGARPA, 2012).

2.5. Protocolos para sincronizar el celo en hembras receptoras

2.5.1. Sincronización del celo con prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF)

La $PGF_{2\alpha}$ y sus análogos son ampliamente utilizados para sincronizar los celos de la hembra bovina (Odde, 1990). La $PGF_{2\alpha}$ causa la regresión del cuerpo lúteo (CL) a partir del día 5 del ciclo estral y su efecto luteolítico es máximo entre los días 12 y 17 (Odde 1990). Sin embargo, el estadio del folículo dominante en el momento de la aplicación de la $PGF_{2\alpha}$ produce una variación de la manifestación del celo y la ovulación tiene lugar 48 a 96 h después (Kastelic y Ginther, 1991).

Generalmente se utilizan tratamientos con dos dosis de $PGF_{2\alpha}$ con 11 a 14 d de intervalo y detección por 5 - 7 d después de la segunda aplicación (Mapletoft *et al.*, 1986; Broadbent *et al.*, 1991). Estas dos aplicaciones son efectivas cuando hay una gran proporción de hembras ciclando y 80 % de ellas deberían ser observadas en celo, pero por problemas de detección de celos el porcentaje de receptoras que son seleccionadas para recibir un embrión raramente supera 50 % (Bó *et al.*, 2002).

2.5.2. Sincronización del celo con hormona liberadora de Gonadotropina (GnRH) y $\text{PGF}_{2\alpha}$, protocolo Ovsynch

La GnRH ha sido muy utilizada para el control del desarrollo folicular. Ésta induce la ovulación del folículo dominante presente al momento del tratamiento (Macmillan y Thatcher, 1991) y se han desarrollado protocolos que utilizan GnRH y $\text{PGF}_{2\alpha}$ para IATF (Inseminación Artificial a Tiempo Fijo) en ganado de carne y leche (Geary *et al.*, 1998; Pursley *et al.*, 1995; Pursley *et al.*, 1997; Thatcher *et al.*, 2001).

Este protocolo se conoce como Ovsynch (Pursley *et al.*, 1995) y consiste en una inyección de GnRH, seguida 7 d más tarde por una inyección de $\text{PGF}_{2\alpha}$, una segunda inyección de GnRH 48 h después de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ e IATF 15 h después. El objetivo de la primera inyección de GnRH es inducir la liberación de LH, resultando en la ovulación del folículo dominante y en la emergencia de una nueva onda folicular 2 d después (Martínez *et al.*, 1999). La administración de $\text{PGF}_{2\alpha}$ 7 d después induce la lisis del CL y la segunda inyección de GnRH induce la liberación de LH que sincroniza la ovulación (Pursley *et al.*, 1995).

2.5.3. Sincronización con progesterona

Los progestágenos son compuestos similares a la progesterona y se usan para sincronizar el celo en programas de IATF. El uso de estrógenos y progestágenos para controlar el desarrollo folicular se basa en el potente efecto de la combinación de estos esteroides sobre las gonadotropinas (Bo *et al.*, 1994).

El protocolo más utilizado, consiste en administrar 2 mg de benzoato de estradiol (BE) por vía intramuscular (im) en el momento de la inserción del dispositivo intravaginal con progesterona (P4; día 0), para sincronizar el desarrollo folicular (Moreno *et al.*, 2001; Bó *et al.*, 2002). El día siete se retira el dispositivo intravaginal y se administra $\text{PGF}_{2\alpha}$ (para inducir la luteólisis), y el día ocho se coloca 1 mg de BE para sincronizar la ovulación. Se realiza la IATE entre las 52 y 56 h después del retiro del dispositivo ya que la mayoría de los animales ovulan aproximadamente a las 66 h (Cutaia *et al.*, 2001).

2.6. Criopreservación de embriones

La criopreservación mediante la congelación posibilita almacenar embriones de una amplia variedad de especies de mamíferos, sin que pierdan su capacidad de desarrollarse. Si bien los embriones son un conjunto de células, se aplican principios criobiológicos originalmente estudiados en células aisladas como los linfocitos y fibroblastos (Cabodevil y Teruel, 2001).

En la actualidad la congelación ya cuenta con equipos que realizan el proceso automáticamente, utilizando diferentes programas y productos. La posibilidad de congelar embriones, permite el intercambio comercial entre países salvando las regulaciones sanitarias, facilitando y abaratando la transportación (Roa *et al.*, 1998).

La criopreservación tiene ventajas durante la ejecución del programa de TE, como: disponer vacas receptoras en condiciones óptimas, programar los empadres y partos, obtener embriones sexados, traslado para el comercio internacional y nacional de material genético (Roa *et al.*, 1998; Cabodevil y Teruel, 2001). Otra ventaja es que permite disponer de hembras donadoras y receptoras en diferentes tiempos, posibilita

transferir y conservar embriones en bancos de germoplasma hasta poder analizar los registros de producción de la descendencia (Cabodevil y Teruel, 2001).

El éxito de un programa de TE está condicionado por las receptoras, quienes influyen en el porcentaje de preñez y el éxito económico. De las receptoras también depende que el embrión se implante y se lleve a término la gestación (Fuentes *et al.*, 2005).

El número medio limitado de cinco a seis ovocitos que pueden ser recolectados por extracción, hacen que su criopreservación en mamíferos sea de gran interés para la investigación básica y las aplicaciones comerciales (Albarracín *et al.*, 2005). De este modo, los ovocitos de algunas especies de mamíferos han sido criopreservados satisfactoriamente a través de procedimientos de congelamiento lento o vitrificación, pero las tasas posteriores de fertilización y desarrollo son más bajas que aquellas obtenidas usando ovocitos frescos (Albarracín *et al.*, 2005). La congelación afecta la viabilidad de los embriones producidos *in vivo* y en mayor medida se afectan los producidos *in vitro* o manipulados (Cutini *et al.*, 2000).

2.6.1. Método de vitrificación

Tammann en 1898 investigó por primera vez el proceso de vitrificación, 60 años después Luyet reconoció el potencial de alcanzar un estado libre de hielo durante la criopreservación (Kuleshova y Lopata, 2002).

Rall y Fahy (1985) introdujeron la técnica de vitrificación en la conservación de embriones, la cual presenta ventajas respecto a la congelación convencional; por ejemplo, no existe formación de cristales de hielo, mayor rapidez en el procesamiento

de cada muestra y menor costo por prescindir de máquinas congeladoras programables; por ello la vitrificación, es una técnica que está reemplazando a la congelación convencional, para conservar embriones *in vitro* (Petit y Edidin, 1974; Lehn-tense y Rall 1983).

El estado vítreo se obtiene al enfriar rápidamente un medio líquido, en ausencia de cristales de hielo y elevada viscosidad (Rall y Fahy, 1985). Esta solución adquiere un aspecto amorfo similar al vidrio, del cual toma su denominación.

Las ventajas de la vitrificación sobre la congelación tradicional es que evita la formación de cristales de hielo, disminuye el daño causado por enfriamiento, no requiere de equipos caros ni sofisticados y es sencilla de realizar (Cando, 2005).

2.6.2. Método convencional o curva lenta

El método de congelación convencional consiste en tres pasos: 1. Adición de una a dos concentraciones molares de glicerol o cualquier otro criopreservador en la suspensión del embrión; 2. Control de la temperatura y almacenamiento de congelación de la suspensión; 3. Caracterización de la secuencia de cambios en el volumen osmótico de las blastómeras durante el proceso de criopreservación. Este proceso convencional, se usa con embriones de bovinos de siete d (Roa *et al.*, 1998).

Los crioprotectores (CRIP) utilizados en esta técnica son permeables, siendo el glicerol y el etilenglicol los utilizados más frecuentemente. Durante la fase inicial de preenfriamiento, los embriones se exponen a la presencia del crioprotector en una fase que se denomina de equilibración. La respuesta inmediata del embrión ante la

presencia de un crioprotector permeable es una rápida disminución de volumen por pérdida del agua intracelular, hasta que se alcanza el equilibrio.

Este fenómeno se debe a la hiperosmolaridad inicial de la solución extracelular ya que los embriones son mucho más permeables al agua que a los crioprotectores; la contracción se detiene cuando se alcanza el equilibrio entre la salida de agua y la entrada del CRIP. A medida que el CRIP penetra en el embrión, éste se expande gradualmente a causa de una entrada de agua para el mantenimiento del equilibrio osmótico. La mayoría de los embriones mamíferos se congelan con la técnica tradicional utilizando crioprotectores permeables, con tasas de congelación lentas y de descongelación relativamente rápidas.

2.7. Transferencia de embriones en ganado bovino

A continuación se describen algunas investigaciones específicas realizadas con TE con genotipos similares al CLT y en condiciones tropicales.

2.7.1. Efecto del CIDR sobre la tasa de preñez en vacas de carne

El centro de producción agropecuaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León y el rancho “El 27” en Tamaulipas, encontraron que con los embriones frescos se obtuvieron porcentajes de preñez de 33.3 y 31.2, y con los embriones congelados-descongelados de 14.2 y 50.0, para los periodos de 7 y 14 d posteriores a la colocación del CIDR (Ledezma *et al.*, 2011).

2.7.2. Producción y trasplante de embriones congelados de bovinos Criollo Limonero

El Criollo Limonero (CL) de Venezuela es una raza criolla, que como el CLT se caracteriza por su gran resistencia a las condiciones climáticas del trópico cálido, destacan su fertilidad y su temperamento lechero. Se superovularon 32 hembras elite en dos periodos, obteniéndose 375 embriones, de los cuales 253 fueron transferibles, 122 no transferibles, además se obtuvieron 43 oocitos no fecundados. Se descongelaron 70 embriones de los cuales 60 (85.7 %) se consideraron transferibles a receptoras mestizas. De 37 embriones transferidos 18 (48.6 %) resultaron en gestación positiva a la palpación rectal de 40 a 50 d (Gonzales *et al.*, 1997).

2.7.3. Análisis multifactorial de la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones en Colombia

En dos localidades de Colombia (Jericó, Antioquia y Montelíbano, Córdoba), se utilizaron 174 receptoras de dos a seis años de los genotipos Brangus, Romo/Angus/Cebú, Cebú/Angus, Blanco Oreginegro/Angus/Cebú, ^{3/4}Angus, Angus/Cebú y otros. Se obtuvieron embriones calidad 1 congelados por curva lenta y transferidos a 123 receptoras; los embriones calidad 2 y 3 fueron transferidos en fresco a 51 receptoras, que presentaron cuerpo lúteo mayor de 14mm. Las variables respuesta fueron: diámetro de cuerpo lúteo (a través de ultrasonografía), concentración de progesterona (determinada a través de una muestra de sangre) y porcentaje de gestación (diagnosticada por ecografía a los 60 d). Los porcentajes de gestación fueron 31% (16 de 51) con embriones frescos y 46 % (57 de 123) con embriones congelados. (Rodríguez *et al.*, 2007).

2.8. El agroecosistema y la ganadería

El concepto de agroecosistema ofrece un marco de referencia para analizar sistemas de producción agropecuarios en su totalidad, incluyendo el conjunto de entradas, salidas y las interacciones entre sus partes. Los agroecosistemas se desarrollan a partir de la modificación de un ecosistema con la intervención del hombre, con el objetivo de evaluar, analizar y comprender los sistemas de producción, para dar soluciones específicas, analizadas, discutidas e implementadas a diversos problemas, para contribuir en la producción de alimentos, materias primas, servicios ambientales y otros satisfactores que la sociedad demanda (Martínez, 2001; Ruiz *et al.*, 2004).

El término agroecosistema es una palabra compuesta (agro-ecosistema) donde *agro* del latín *ager* significa tierra, suelo como fuente de producción y *ecosistema* (*oikos* vocablo griego) significa lo que se habita o se hace habitable. Este término lo introdujo Tansley en el año 1935 como el sistema total en el sentido físico, que incluye el complejo de organismos y también los complejos factores físicos que forman el ambiente del bioma, aunque los organismos parecen ser el interés principal, no se les puede separar de su ambiente, en el cual forman un sistema físico (Pérez, 2003).

El enfoque de Agroecosistemas se sustenta en la concepción de sistemas aplicado a la agricultura. El enfoque de sistemas es la forma de observar la realidad como un arreglo de componentes o un conjunto de elementos unidos o relacionados dinámicamente, que forman y actúan como una unidad llamada sistema (Becht, 1974), demostrando las propiedades del todo y no solo de sus componentes (Checkland, 1993; Morales *et al.*, 2004).

Dentro de las unidades de estudio intervienen el productor o en casos especiales un grupo de productores, como componente que toma las decisiones sobre el manejo de su unidad; inclusive se llega a ver favorecido con la participación de profesionales, instituciones, personal relacionada con procesos de producción, transformación, industrialización y comercialización de los alimentos para consumo humano, favoreciendo al productor, la población rural y los consumidores (Martínez *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2004; Ruiz, 2006).

Los agroecosistemas son ecosistemas o unidades ecológicas, conformadas por los componentes bióticos y abióticos, intencionalmente perturbados a través de la influencia humana, con el propósito de establecer una producción agropecuaria, introduciendo severos cambios en la estructura y función de los ecosistemas naturales (Altieri, 1995; Gliessman, 1995). El agroecosistema está representado por la finca, parcela o pequeña propiedad, en relación con su controlador. Considerando a un agroecosistema desde el nivel de una finca, hasta un grupo de ellas, siempre y cuando las decisiones del controlador, incidan en el grupo de fincas como una unidad (Morales *et al.*, 2004).

La ganadería es un componente importante dentro de los agroecosistemas, ya que es una actividad fundamental dentro de la industria de alimento, por la producción de materias primas que el país demanda. El sistema de producción bovina está inmerso en el agroecosistema, por estar conformado por diferentes elementos como: el hato animal, la finca que a su vez es modificada y adecuada para la producción agropecuaria, los empleados (directos e indirectos), las instalaciones y el ganadero o

productor, quien es el tomador de las decisiones para el manejo adecuado de su sistema de producción.

En este tipo de sistema de producción, el ganadero es quien decide las entradas o insumos que llegaran a beneficiar al sistema, por ejemplo: biotecnologías reproductivas de última generación como la Inseminación Artificial y la Transferencia de Embriones, técnicas de conservación de embriones y la capacitación del ganadero y personal que incursiona dentro del sistema. El conjunto de entradas para el caso de la producción bovina, trae como beneficio nuevas y mejores generaciones de bovinos genéticamente superiores que pudieran incrementar la producción de leche o carne dependiendo de la orientación zootécnica de la raza. De igual manera, es de mayor importancia el obtener un banco de germoplasma *in situ* de las mejores hembras y sementales bovinos y llevar un proceso continuo de transferencia de tecnologías que fortalezca e incremente la producción dentro de la finca (Figura 1).

El manejo de la finca se hace más eficiente y el ganadero se beneficia de las salidas de productos o resultados que se obtienen de los procesos en el sistema de producción, por ejemplo: la producción de leche, la producción de reemplazos, semen de toros probados, embriones congelados de vacas elite, sementales y hembras de venta para pie de cría, becerros y vacas para el abasto.

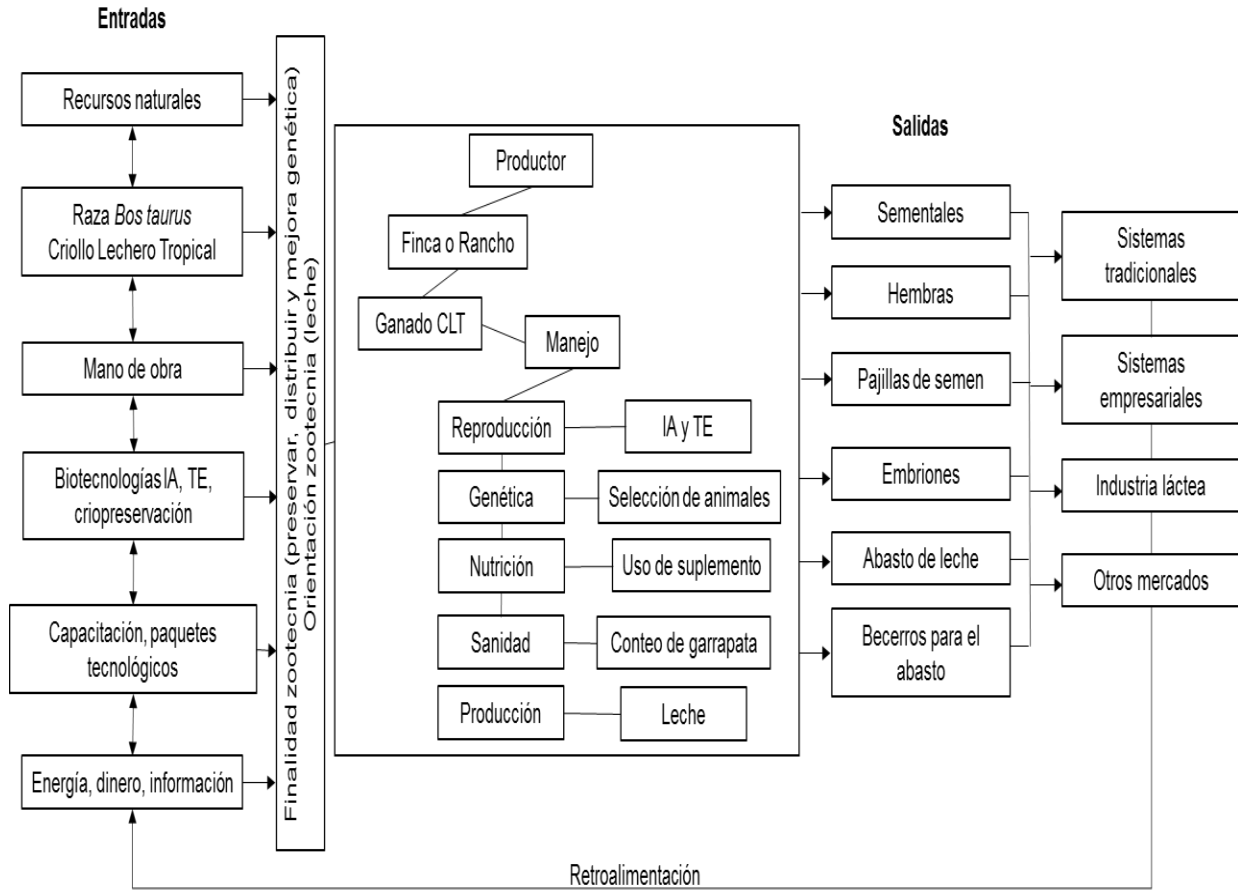


Figura 1. Modelo de agroecosistema bovino.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar dos métodos de criopreservación de embriones Criollo Lechero Tropical transferidos a hembras receptoras puras y mestizas.

3.2. Objetivos específicos

- a) Estimar el porcentaje de gestación para los métodos de criopreservación.
- b) Estimar el porcentaje de gestación por genotipo de la hembra receptora.

4. HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis general

Con la criopreservación de embriones CLT por curva lenta se obtiene un mayor porcentaje de gestación en hembras CLT y mestizas, que con la vitrificación.

4.2. Hipótesis específicas

- a) La criopreservación con el método de curva lenta tiene un mayor porcentaje de gestación que la criopreservación por vitrificación.
- b) Las hembras mestizas tienen un porcentaje mayor de gestación que las hembras puras.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Colegio de Postgraduados Campus Veracruz (CP) y el rancho “Los Encinos” (OG).

5.1. Localización de las áreas de estudio

El CP está ubicado en la carretera federal Veracruz-Xalapa kilómetro 26.5, Predio Tepetates, Municipio de Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, a 19° 11' 38" N y 96° 20' 13" O, y una altura de 23 msnm. El área ganadera tiene una superficie de 40 ha, con relieve irregular con diferencia de altitud de 14 a 19 msnm. El clima es cálido subhúmedo, $AW_1 (w) (i')$ g, con temperatura media anual de 26.5 °C y precipitación pluvial anual de 1230 mm, distribuida entre los meses de mayo a octubre (García, 1988).

El rancho “Los Encinos” está ubicado a 12 km al norte del poblado de Xixila, Municipio de Olinalá Guerrero, en la Región de la Montaña, a 17° 59' 51" N y 98° 52' 08" O y 1284 msnm. El área ganadera cuenta con 100 ha, con pendientes muy pronunciadas y relieve irregular. Predomina el clima semicálido subhúmedo $Aw_0 (w)$, con temperatura media anual de 22 °C y precipitación pluvial media anual de 800 mm, con lluvias predominantes en los meses de julio a septiembre (García, 1988).

5.2. Manejo de hembras receptoras

En el CP la investigación inició el día 1 de junio de 2013. Se formó un lote de 23 hembras receptoras de las cuales se seleccionaron 20 que presentaran ovario ciclando,

cérvix que permitiera el paso de la pipeta, sin presencia de quistes ováricos y fibrosis en el tracto uterino. Los genotipos utilizados fueron CLT (n=11) y mestizas (Suizo Pardo X Cebú, n=9), de 64.8 ± 5.1 meses de edad y 439.2 ± 12.1 kg de peso.

En OG la investigación inicio el día 15 de septiembre de 2013. Se formó un lote de 35 vacas multíparas con lactancia mayor de 90 d, de las cuales se seleccionaron 20 como receptoras considerando los mismos criterios que en CP. Los genotipos en diferentes proporciones de CLT fueron CLT puro (n=10), mestizas CLT X Holstein (n=5), CLT X Suizo Pardo (n=3) y CLT X Cebú (n=2) de 92.1 ± 5.2 meses de edad y 382.8 ± 7.1 kg de peso.

Con base a lo establecido por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS por sus siglas en inglés) que menciona que las receptoras deben estar ciclando y ser reproductivamente sanas (Elsden, 1980; Mapletoft, 1980; Wright, 1981; Mapletoft, 1982), las hembras receptoras se palparon vía recto-vaginal en dos ocasiones, para cerciorarse de las condiciones uterinas. El balance nutricional (energía, proteína, vitaminas, minerales y agua) deben ser adecuados y se mide a través de la Condición Corporal (CC). Ésta ejerce una influencia marcada sobre las tasas de preñez, pues las mejores se obtienen cuando los valores son intermedios, de 2 a 3 (Stroud y Hasler, 2006). La CC fue 2.80 ± 0.01 y de 2.78 ± 0.10 para CP y OG, en la escala de 1(emaciado) a 5 (obeso) (Houghton *et al.*, 1990).

Las hembras receptoras se desparasitaron con ivermectina al 1 % (Virbamec classic) aplicando 7 ml por animal vía subcutánea y externamente por aspersion con amitraz al 12.5% (Bovitraz).

Se detectaron calores por dos horas, de 8 a 9 y de 17 a 18 h. durante un mes, mediante la observación de las montas directas, montas fallidas, intentos de monta, presencia de flujo vaginal y la presencia de sangrado aproximadamente a los tres días posteriores a la presencia del celo.

5.3. Alimentación de las receptoras

En el CP las receptoras pastorearon en potreros de grama nativa (*Paspalum spp*), estrella africana (*Cynodon plectostachyus*) y pará (*Brachiaria mutica*), bajo un sistema de rotación. Se proporcionó durante 50 d 1 kg d⁻¹ animal⁻¹ de suplemento comercial con 18 % de proteína cruda y agua a libertad. Este grupo de receptoras fueron pesadas individualmente al inicio del experimento y dos días antes de la TE con una báscula digital móvil marca True Test.

Las receptoras de OG pastorearon en potreros de grama nativa (*Paspalum spp*) y leguminosas locales como el tlahuitol (*Lysiloma divaricatum*) y el huaje blanco (*Leucaena leucocephala*). Por un periodo de 60 d a cada receptora se le suministró diariamente alimento concentrado comercial de 18 % de proteína, pollinaza y maíz molido a razón de 1.5, 1.5 y 0.5 kg. Las receptoras se pesaron 2 días antes de la TE.

Cada receptora recibió una inyección vía intramuscular 8 ml de suplemento mineral y vitamínico de selenio y vitamina E (Mu-Se[®]) (laboratorio Essex Animal Health Friesoythe), 15 d antes de iniciar el protocolo de sincronización del celo. Se incluyeron dos dosis de bustafosfan y protector hepático (Catosal ^{M.R.} con vitamina B₁₂) (Laboratorio Bayer Health Care), inyectando vía intramuscular, 10 ml animal⁻¹ entre los 15 y 30 d previo al inicio al programa de sincronización del celo.

5.4. Selección de Embriones transferibles

Todos los embriones producidos *in vivo*, provenían de óvulos de hembras puras CLT, fertilizados con semen de los mejores sementales puros de la misma raza, evaluados genéticamente positivos para producción de leche. En el CP fueron seleccionados 20 embriones calidad uno, 10 criopreservados por curva lenta y 10 por vitrificación. En OG se seleccionaron 20 embriones calidad uno, nueve congelados por curva lenta y 11 por vitrificación.

Los embriones criopreservados por curva lenta se alojaron de manera individual en una pajilla de 0.25 ml, rotulados con datos de la donadora para su identificación, la raza y calidad del embrión de 1 (excelente) a 3 (regular). Los embriones criopreservados por vitrificación se alojaron en cryotops de uno a cuatro, identificados con datos de la donadora, cantidad y calidad de los embriones.

5.5. Protocolo de sincronización del celo

El protocolo de sincronización tiene el objetivo de inducir un celo fértil a tiempo fijo y obtener cuerpos lúteos aptos para realizar la TE. El protocolo considerado para el presente estudio incluyó estrógenos y progestágenos como se observa en la Figura 1.

El protocolo de sincronización de celo, inició el día cero donde las receptoras recibieron un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (P₄) (1.9 mg) (CIDR 1900 cattle insert, DEC Manufacturing N2 Pfizer USA) y se aplicó una inyección con 2 mg de benzoato de estradiol (Be₂) vía intramuscular (Estilbo vitaminado, Laboratorio SYVA España). El día 5 se inyectó 400 UI de eCG (Folligon 1000 U.I. Intervet México) y una

inyección de 5 ml de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (Lutalyse, Pharmacia & Upjohn, Pfizer USA). El día 8 se retiró el dispositivo intravaginal y se inyectó 1 mg de cipionato de estradiol (Ce_2) (E.C.P. Pfizer México). El día 10 se observó la presencia de actividad relacionada con signos propios del celo y se consideró el proceso de ovulación en las próximas 24 h. El día 17 previo a la TE se realizó una palpación rectal para diagnosticar la presencia de cuerpos lúteos en ovarios y determinar con ello el cuerno uterino donde se depositó el embrión.

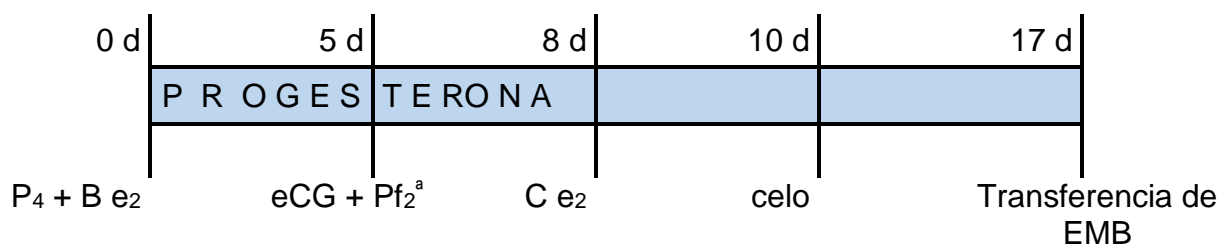


Figura 2. Protocolo de sincronización de celo para receptoras

5.6. Proceso de Transferencia de Embriones

Los embriones criopreservados por curva lenta se indujo un deshielo o derretimiento del líquido solidificado a lo que se le conoce como descongelación, por lo que no fue necesaria la remoción del crioprotector, por ser de bajo peso molecular se difunde rápidamente en el medio uterino, lo que cede a la transferencia directa luego de ser descongelado. El procedimiento consistió en extraer la pajilla del termo con nitrógeno líquido, sumergirla en agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 s, retirar el tapón del extremo y colocarlo en el aplicador para su transferencia.

A los embriones vitrificados el paso de reanimación se le denomina calentamiento, debido al proceso que sólo lleva a cabo cambios de temperatura y no de descongelamiento del cristal de hielo. La preparación del embrión para la transferencia

consistió en utilizar una solución de calentamiento (SC), compuesta por PBS (Bioniche, Pharma, Canadá) con sustituto de suero sintético (SSS) al 20 % más sucrosa 1 M (sigma aldrich); una solución de dilución (SD) compuesta de PBS con SSS al 20 % más sucrosa 0.5 M y una solución de lavado (SL), compuesta por PBS y SSS al 20 %.

Se colocó una gota de SC (300µl) en una caja Petri a 37 °C y en otra se colocaron 2 gotas de SD y 3 gotas de SL de 20 µl cada una a temperatura ambiente. El calentamiento de los embriones se realizó destapando el cryotop, se dejó salir el nitrógeno y de inmediato se sumergió en SC por 1 min. Posteriormente se colocaron los embriones en la SD por 2 min en cada gota y por último se expusieron en la SL por 3 min en cada gota (Kuwayama, 2007). Removidos los crioprotectores, el embrión se cargó en una pajilla de 0.25 ml con solución PBS y se colocó en el aplicador de transferencia.

Los procedimientos para la preparación de los embriones para la transferencia, se realizaron de acuerdo a la disponibilidad de recursos con que se contaban en condiciones de campo y no en un laboratorio expofeso, lo que pudo influir en los resultados.

Previo a la TE, se verificó la presencia de un cuerpo lúteo de diámetro mayor de 1.5 cm por medio de palpación recto-vaginal. Esto debido a que el cuerpo lúteo actúa sobre los órganos genitales de la hembra, es responsable de secretar progesterona, preparar el útero para el establecimiento y mantener la gestación y está relacionado directamente con el porcentaje de gestación de las receptoras (Alila y Dowd, 1991; Tovia, *et al.*, 2008). Sin embargo, el tamaño, calidad del cuerpo lúteo y concentración de

progesterona en la sangre no son determinantes en el inicio de una gestación (Herzog, *et al.*, 2010; Butler, *et al.*, 2011).

Antes del inicio de la TE se realizó una asepsia a la parte alta de la cola y vulva de cada receptora para evitar infecciones vaginales, también se aplicó una inyección vía epidural de lidocaína (Pisicaina 2 %, PISA, Agropecuaria S.A. de C.V. México) para evitar contracciones en el tracto uterino de la receptora. Para depositar el embrión se utilizó un aplicador metálico de transferencia cubierto con una funda estéril, se introdujo en la vagina pasando por el cérvix mediante manipulación y guiándolo al cuerno uterino ipsilateral a la ovulación, en donde se depositó el embrión (Hafez y Hafez, 2002). El diagnóstico de gestación se realizó mediante palpación recto-vaginal 50 d posteriores de la transferencia del embrión.

Se calculó el costo que implicó la TE para CP y OG por receptora, en donde el costo más alto fue el embrión (\$ 1,500.00) seguido por la compra de alimento comercial y el costo general de los fármacos utilizados (Anexo 1). Para OG la compra de alimento (\$ 940.50) fue mayor que en CP (\$ 544.50) por las condiciones corporales que presentaban las receptoras y por estar lactantes (Anexo 2).

5.7. Análisis estadístico

En el CP los tratamientos se asignaron aleatoriamente a las receptoras de ambos genotipos, resultando seis embriones para CLT puras y cuatro para mestizas por curva lenta y cinco vitrificados en receptoras CLT puras y cinco en mestizas.

En OG la asignación aleatoria de los tratamientos a las receptoras de ambos genotipos resultaron, en cuatro embriones por cuerva lenta en receptoras CLT puras y cinco con mestizas, para embriones vitrificados seis en receptoras CLT puras y cinco en mestizas.

Las variables de respuestas fueron:

- Porcentaje de gestación por genotipo (CLT puro y Mestizo) y tratamiento (curva lenta y vitrificación)
- Tamaño del cuerpo lúteo por genotipo (1 pequeño, 2 mediano y 3 grande)

El análisis de la frecuencia de los datos se realizó con la estadística de Ji-cuadrada (SAS, 2008).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se encontraron efectos significativos del método de criopreservación y del genotipo de las receptoras ($p>0.05$) en el porcentaje de gestación, tanto en el CP como en OG. Los porcentajes de gestación por el método de criopreservación fueron 10 % (1/10) y 20 % (2/10) para curva lenta y vitrificación (Figura 2) y el porcentaje de gestación por genotipo fueron 27 % (3/11) y 0 % (0/9) para receptoras CLT puras y mestizas en el CP.

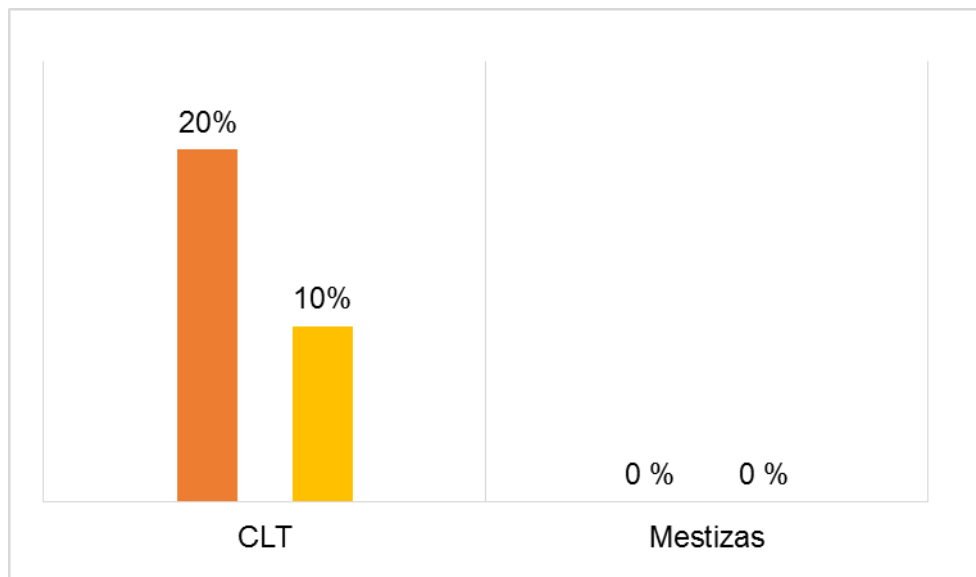


Figura 3. Porcentaje de gestación con embriones CLT por vitrificación (■) y por curva lenta (■), con el genotipo de la receptora CLT: Criollo Lechero Tropical y mestizas en CP.

Los porcentajes obtenidos en OG por el método de criopreservación fueron de 11 % (1/9) y 27 % (3/11) para Curva lenta y vitrificación respectivamente (Figura 3) y el porcentaje de gestación por genotipo fueron 30 % (3/10) y 10 % (1/10).

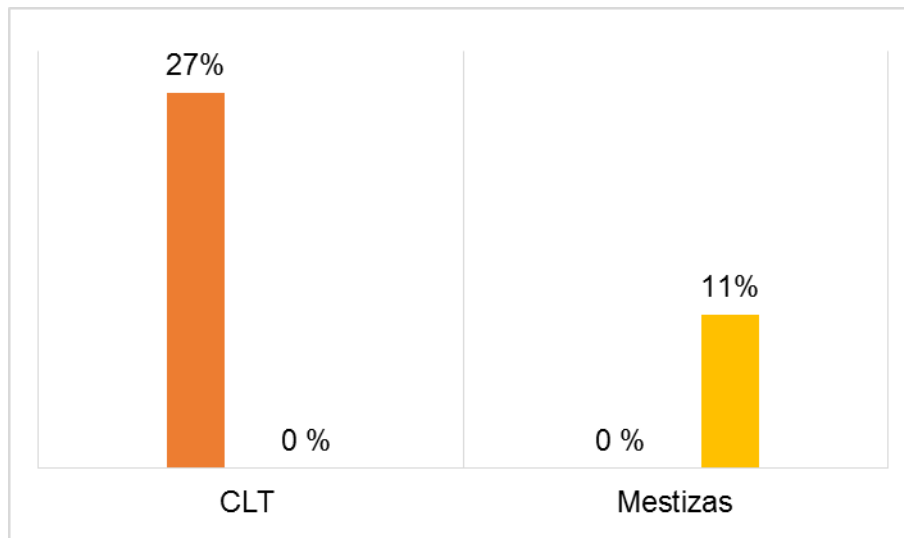


Figura 4. Porcentaje de gestación con embriones CLT por vitrificación (■) y por curva lenta (■), con el genotipo de la receptora CLT: Criollo Lechero Tropical y mestizas en OG.

Las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Sin embargo, se observó una tendencia consistente a mayor porcentaje de gestación para la vitrificación y receptoras puras CLT. Se tuvieron totales como sigue: 2/19 -10.5 %, aproximadamente una cuarta parte de lo reportado en la literatura por curva lenta y 5/21 -23.8 %, aproximadamente la mitad de lo reportado en la literatura por vitrificación. Por genotipo fueron: 6/21 -28.6 %- puras y 1/19 -5.3 %- mestizas. La vitrificación fue 5/2 más del doble que la curva lenta, las puras fueron 6/1, seis veces más que las mestizas.

Los porcentajes de gestación obtenidos fueron bajos, en comparación a 48.6 % en embriones criopreservados por curva lenta y transferidos a receptoras mestizas Cebú X razas lecheras en Venezuela (González *et al.* 1997), 33.2 y 13.9 % de gestación en condiciones templadas y en época cálida respectivamente en vacas receptoras Holstein lactantes, con tres ordeños por día en el altiplano central de Aguascalientes,

México (Lozano *et al.* 2010), en donde señala que el estrés calórico afectó la viabilidad embrionaria y el medio ambiente materno para el establecimiento de la gestación.

Bényei *et al.* 2006 obtuvieron 41 % de gestación en receptoras cruza de *Bos indicus* X *Bos taurus* con embriones Holstein congelados por curva lenta en condiciones tropicales de Brasil, 49 % y 54 % de gestación en receptoras Angus y Brahaman, con embriones de la raza Romosinuano y Brahaman realizado en Brooksville, Florida USA, donde la edad de las receptoras utilizadas y la calidad del embrión afectaron el porcentaje de gestación (Chase *et al.* 2009). Youngs (2011), con el método de curva lenta en bovinos obtuvo 45% de gestaciones con embriones producidos *in vitro*. Los porcentajes de gestación obtenidos con la aplicación del método de curva lenta con embriones CLT fueron menores que los reportados por otros autores (González *et al.* 1997, Bényei *et al.* 2006, Chase *et al.* 2009, Youngs 2011) y similares a lo reportado con Lozano *et al.* (2010), debido a las condiciones de estrés calórico que se presentan en el área de estudios del CP.

La TE en CP se realizó en la época cálida en el mes de junio y julio, con temperatura media de 34.4 °C durante los días de transferencia, por lo que el estrés calórico pudo afectar la viabilidad del embrión disminuyendo el porcentaje de gestación (Lozano *et al.* 2010), en comparación de OG que se transfirió en el mes de octubre con un temperatura media de 22.5 °C durante los días de transferencia; sin embargo, Oyuela & Jiménez (2010) mencionaron que factores como el manejo de las receptoras en la ordeña y en las instalaciones ganaderas, golpes en exceso al animal, deficiente suplementación mineral y alimentación (Thatcher *et al.* 2001; Stroud & Hasler 2006) pueden afectar los resultados en el porcentaje de gestación de la TE.

En la criopreservación por vitrificación, se utilizan soluciones acuosas muy concentradas de agentes crioprotectores que impiden la formación de cristales de hielo durante su enfriamiento, por lo que se consideran como un método más avanzado a la criopreservación por curva lenta. El porcentaje de gestación con embriones producidos *in vivo* y congelados por vitrificación es 10 % menor al que se obtiene con la transferencia de embriones frescos (Hasler 2014).

En diversos estudios con embriones vitrificados se obtuvieron porcentaje de gestación de 55 % en vaquillas receptoras Holstein en el valle de San Joaquín, California Estados Unidos, transferidas en verano (mayo-septiembre) e invierno (Octubre-Abril) alojadas en corrales abiertos y con un sistemas de refrigeración, justificando que mitigar los efectos del estrés calórico deben aumentar el porcentaje de gestación (Chebel *et al.* 2008), 64.9% en receptoras novillas de 15-18 meses de edad de la raza Holstein, con temperaturas media de 12.2 °C (Octubre-Abril) y 17.3 °C (Mayo-Septiembre) en España (Hidalgo *et al.* 2004), 45 % con vacas receptoras adultas de 4 a 6 años de edad raza Polled Herford en Buenos Aires Argentina (Martínez y Valcárcel 2008) y 34.5 % en Brasil en receptoras Holstein lactantes (Rodríguez *et al.* 2010). Los resultados obtenidos en este estudio son inferiores a lo reportados por los autores citados, aunque estos trabajos fueron realizados con ganado Holstein especializado en leche y Polled-Herford en carne, con un gran número de receptoras que van desde 275 a 1183, la edad y las condiciones climáticas donde se realizaron las investigaciones.

Dochi *et al.* (2008) indicaron que las vaquillas son las receptoras más adecuadas, por tener menor incidencia de estrés nutricional, enfermedades uterinas y problemas post-

parto; un mayor número de vaquillas responden al tratamiento de sincronización con progesterona y quedan preñadas después de la TE (Stroud & Hasler 2006).

Los menores porcentajes de gestación obtenidos en el presente estudio pueden estar relacionados a factores endocrinos, celulares, moleculares (Fuentes y de la Fuente 2007) o ambientales por estrés calórico (Putney *et al.* 1989; Hernández *et al.* 2004), aunque las hembras CLT podrían ser menos sensibles a condiciones adversas de temperatura y humedad relativa altas, atribuibles a su proceso de naturalización a los climas cálidos tropicales de América (Paricote 2000; Santellano *et al.* 2011).

La calidad y el desarrollo del embrión ejercen una marcada influencia sobre los resultados de la TE. Una mórula transferida resulta en menor porcentaje de preñez que cuando se transfiere un embrión es estadio más avanzado (Looney *et al.* 2006). Hasler (2001) encontró porcentajes de gestación estadísticamente diferentes para embriones calidad 1 (73.2 %), 2 (68.3 %) y 3 (56.3 %), pero no indicó diferencias entre diversos estadios de desarrollo. El porcentaje de gestación es mayor cuando se transfiere embriones de calidad excelente y de mayor desarrollo (blastocitos) (Oyuela & Jiménez 2010).

De las 20 receptoras en el CP, ocho (40 %) presentaron cuerpo lúteo calidad tres y ocho (40 %) calidad dos, con diámetros superiores a 1.5 cm, tamaño considerado óptimo para realizar la TE; cuatro receptoras (20 %) presentaron cuerpos lúteos calidad uno, cuyo diámetro fue inferior a 1.5 cm, tamaño no apropiado para hacer la transferencia (Figura 4); sin embargo a las 20 receptoras se le transfirieron los embriones.

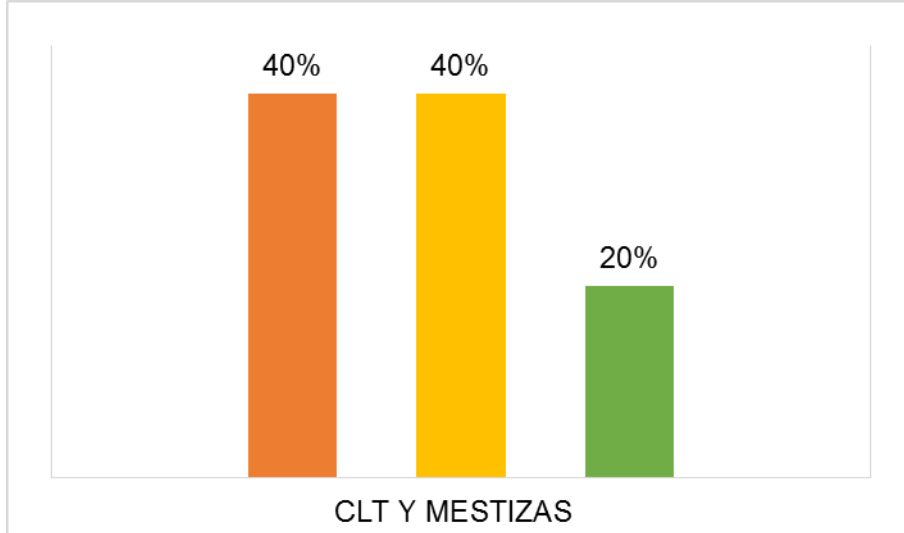


Figura 5. Porcentaje de la clasificación de cuerpos lúteos calidad tres (■), dos (■) y uno (■) en el genotipo CLT: Criollo Lechero Tropical y mestizas en CP.

El lote de receptoras en OG se conformó de 34 vacas, de estas, 20 (57 %) presentaron cuerpos lúteos óptimos para realizar la TE. De la selección de las receptoras, nueve (45 %) presentaron cuerpos lúteos calidad tres y once (55 %) calidad dos, con diámetro superior a 1.5 cm (Figura 5).

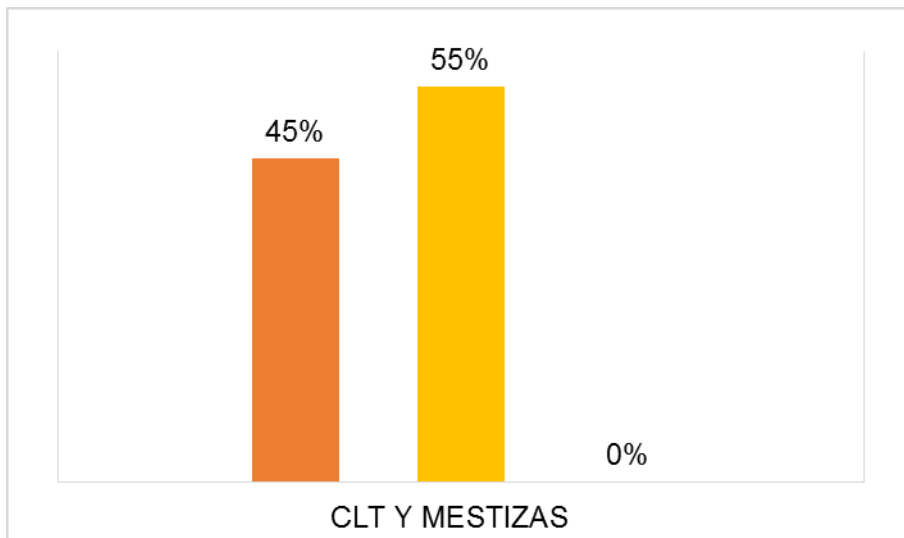


Figura 6. Porcentaje de la clasificación de cuerpos lúteos calidad tres (■), dos (■) y uno (■) en el genotipo CLT: Criollo Lechero Tropical y mestizas en OG.

La estructura más grande de un cuerpo lúteo mantiene la producción de progesterona que a su vez propicia un mayor porcentaje de gestación después de la TE (Drost *et al.* 1999; Baruselli *et al.* 2010); sin embargo, otras investigaciones señalan que no existe correlación positiva entre el tamaño de cuerpo lúteo y la concentración de progesterona con el porcentaje de gestación en las receptoras (Remsen & Roussel 1982; Hasler *et al.* 1987; Looney *et al.* 2006; Hasler 2014).

Baruselli *et al.*, (2000) encontraron 85 % (132/156) de cuerpos lúteos de 18.5 ± 0.4 mm en receptoras Cebú mestizas con diferentes grado de encaste en el trópico cálido de Brasil; tamaño superior a los encontrados en este estudio. En vacas lactantes receptoras Holstein en California, Estados Unidos se obtuvieron 82.9 y 80.2 % de cuerpos lúteos óptimos para TE (Chebel *et al.*, 2008); valores superiores a los encontrado en el presente estudio para OG y similares a los encontrados en el CP.

El cuerpo lúteo presente al momento de la implantación de embrión juega un papel importante en los resultados de la TE, se espera que secreta suficiente cantidad de progesterona para el mantenimiento de la preñes (Oyuela y Jiménez, 2010). Diferentes autores han buscado optimizar este factor mediante el uso de hormonas con la Gonadotropina Crónica equina, Gonadotropina Crónica Humana, Hormona Liberadora de Gonadotropina y Hormona Luteinizante en protocolos de sincronización, para asegurando la formación de un cuerpo lúteo de buen tamaño o estimulando la formación de varios (Binelli *et al.*, 2001; Nasser *et al.*, 2004; Nogueira *et al.*, 2004).

Es importante resaltar que la utilización de tratamientos hormonales tiene efectos benéficos en cuanto a la eficiencia de la sincronización, favoreciendo el porcentaje mayor de receptoras aptas al momento de la transferencia. En las dos áreas de estudios se seleccionaron las receptoras que tuvieran un cuerpo lúteo mayor a 1.5 cm de diámetro en el momento de la transferencia, para asegurar la gestación, pero no se midió la concentración de progesterona en suero sangre para reafirmar esta investigación.

7. CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

Este apartado se presenta la contrastación de las hipótesis de acuerdo a los resultados de la presente investigación.

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos y el genotipo de las receptoras en las dos áreas de estudio. Las hipótesis específicas planteadas indican que con la criopreservación con el método de curva lenta tiene un mayor porcentaje de gestación que la criopreservación por vitrificación y que las hembras mestizas tienen un porcentaje mayor de gestación que las hembras puras. En virtud de los resultados obtenidos, ambas hipótesis se rechazan.

La hipótesis general planteada indica que la criopreservación de embriones CLT por curva lenta se obtiene un mayor porcentaje de gestación en hembras CLT y Mestizas, que con la vitrificación. De acuerdo al sustento indicado en las hipótesis específicas, la hipótesis general se rechaza.

8. CONCLUSIONES

Los porcentajes de gestaciones fueron similares entre tratamientos y bajos comparados con otros genotipos. El método de criopreservación y el genotipo de las receptoras, no influyeron en el porcentaje de gestación para obtener diferencias significativas, esto probablemente se debió al número pequeño de repeticiones utilizado en el estudio. Sin embargo, se observó una tendencia consistente de mayor porcentaje de gestación para el método de vitrificación y en receptoras CLT puras, por presentar un mayor número de cuerpos lúteos óptimos para realizarles TE.

Se desconocen cuáles son los factores que pudieron influir en el bajo porcentaje de gestación. Se sugiere continuar con estos estudios, con la inclusión de factores relacionados con la endocrinología, fisiología reproductiva de las receptoras y el seguimiento de los cambios en el embrión durante su maduración para asegurar su viabilidad.

9. LITERATURA CITADA

- Albarracín J., R. Morató, C. Rojas, and T. Mogas. 2005. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of in vitro matured prepubertal and adult bovine oocytes. *Theriogenology* 63: 890-901.
- Alila H. W., and J. P. Dowd. 1991. The control of corpus luteum function in domestic ruminants. *Oxford Reviews of Reproductive Biology* 13: 203-237.
- Altieri M. A. 1995. *Agroecología: bases científicas para una agricultura sustentable*. Edit. Nordam-Comunidad. CIED, Perú. 325 p.
- Beal, E. E., and R. H. Hinshaw. 2001. Synchronization of estrus and ovulation in bovine embryo transfer recipients Proceedings of the Advanced Embryo Transfer Seminar 12 Annual Meeting of the American Association of Bovine Practitioners, Vancouver BC Canada. 171-173.
- Becht G. 1974. System theory, the key to holism and reductionism. *BSc J.* 24: 569-573.
- Bényei B., I. Komlósi, A., Pécsi, G., Pollott, C., C., Heraldo, A., C., de Ocampos, and M., L., Paula. 2006. The effect of internal and external factors on bovine embryo transfer results in a tropical environment. *Animal Reproduction Science* 93: 268-279.
- Betteridge K., J. 1997. Embryo transfer in farm animals. A review of techniques and applications. Monograph No. 16. Agriculture Canada. 92 p.
- Binelli M., W. W. Thatcher, R. Mattos, and P. S. Baruselli. 2001. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 56: 1451-63.
- Block J., and P. J. Hasen. 2007. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of in vitro produced embryos following transfer to lactating dairy cows. *Theriogenology* 67: 1518-1529.
- Bó G. A., G. Adams, R. Pierson, M. Caccia, H. Tribulo, and R. Mapletoft. 1994. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 41: 1555-1569.
- Bó, G. A., L. Cutaia, y R. Tribulo. 2002. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. Segunda Parte. *Taurus*. 14: 10-21.
- Bó, G. A., M. Caccia, M. Martínez, and R. Mapletoft. 1996. Follicular wave emergence after treatment with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices in beef

- cattle. 13th International Congress on Animal Reproduction, Sydney, Australia. 7: 22.
- Bó, G. A., D. Moreno, L. Cutai, M. Caccia, R. Tríbulo, y H. Tríbulo. 2004. Transferencia de embriones a tiempo fijo: tratamientos y factores que afectan los índices de preñez. *Taurus*, 21: 25-45.
- Bodisco, V., y O. Abreu. 1981. Producción de leche para vacas criollas puras. Recursos genéticos animales en América Latina. FAO. 22: 17-39.
- Bolívar P. A., y J. G. E. Maldonado. 2008. Análisis de costos de esquema de transferencia de embriones bovinos utilizados en Colombia. *Revista Colombiana de ciencias pecuarias* 21:3.
- Broadbent P. J., M. Stewart, and D. F. Dolman. 1991. Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology* 35: 125-139.
- Butler S. A., N. J. Phillips, G. B. Boe-Hansen, G. A. Bó, B. M. Burns, K. Dawson, and M. R. McGowan. 2011. Ovarian responses in *Bos indicus* heifers treated to synchronise ovulation with intravaginal progesterone releasing devices, oestradiol benzoate, prostaglandin F_{2α} and equine chorionic gonadotrophin. *Anim. Reprod. Sci.* 129: 118-126.
- Cabodevila J., y M. Turel. 2001. Criopreservación de embriones bovinos. *Biotecnología de la Reproducción* 149-174.
- Carmona, S., y H. Muñoz. 1966. Intervalo entre partos y número de servicios por preñez en vacas Criollas, Jersey y encastadas de Suizo en clima tropical húmedo. *ALPA. Memoria*, 1: 7-12.
- Cando, J. 2005. Evaluación de la sobrevivencia de embriones de coneja eclosionados, biopsiados y vitrificados por el método open pulled straw modificado. Tesis M Sc. en Reproducción Animal. Universidad Austral de Chile. 88 p.
- Chebel R. C., D. G. Demetrio, and J. Metzger. 2008. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology* 69:98-106.
- Checkland, P. 1993. Pensamiento de sistemas, practicas de sistemas. México, DF: Edit. Grupo Noriega Editores. 367 p.
- Cutaia L., D. Moreno, M. Villata, and G. A. Bó. 2001. Synchrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administered at device removal or 24 hours later. *Theriogenology* 57: 53-72.
- Cutini A., M. Teruel, y J. Cabodevila. 2000. Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. *Taurus* 7:28-39.

- de Alba, J. 1985. El Criollo Lechero en Turrialba. Boletín técnico No.15. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. Turrialba, Costa Rica. 59 p.
- de Alba J., and B. W. Kennedy. 1994. Genetic parameters of purebred and crossbred milking criollos in tropical México. *Prod. Animal* 58: 159-165.
- Demyda, S. P. 2013. Análisis citogenético y celular de la maduración ovocitaria, la capacitación espermática y el desarrollo embrionario temprano en el proceso de la fecundación *in vitro* en *Bos taurus*. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba, Argentina. 122 p.
- Díaz, P., J. de Alba, C. Becerril, A. Rosendo, J. Guerrero, A. Estrella, y B. Rueda. 2005. El ganado Criollo, una alternativa viable para la producción de leche en el trópico mexicano. Colegio de Postgraduados Campus Veracruz. Consultado febrero 2012. Disponible en www.colpos.mx/cveracruz/SubMenu_Publi/pdf/CRILET.pdf
- Ealy A. D., M. Drost, and P. J. Hansen. 1993. Development changes in embryonic resistance to adverse effects or maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.* 76:2899-2905.
- Elsden R.P. 1980. Bovine embryo transfer. *Proc. Soc. Theriogenology*. Omaha, NE USA. pp. 101-133
- Fahy G. M., D.R. Farlane, C. A. Angell, and H. T. Meryman. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*. 21: 407-426.
- FIRA. 2001. Boletín informativo No. 317 Vol. XXXIII 2001. Tendencias y Oportunidades de Desarrollo de la Red Leche en México.
- Fuentes, F., J. Caballero de la Calle, M. Cocero, y R. García. 2005. Influencia de un protocolo MOET (ovulación múltiple y transferencia de embriones) sobre la posterior tasa de gestación de la hembra donante. Universidad de Castilla la Mancha. Ciudad Real. Madrid España. 13 p.
- Fuentes S., y M. J. de la Fuente. 2007. Tasas de gestación de novillas receptoras, sincronizadas con gonadotrofina coriónica equina u hormona folículo estimulante. *Act. Sci. Vet.* 35: s767-s772.
- García, E. 1988. Modificaciones al Sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Geary T. W., J. C. Whittier, E. R. Downing, D. G. LeFever, R. W. Silcox, M. D. Holland, T. M. Nett, and G. D. Niswender. 1998. Pregnancy rates of post partum beef cows that were synchronized using Syncro-Mate B or Ovsynch protocol. *J Anim Sci.* 76:1523:7.

- Gliessman, S. R. 1995. Sustainable agriculture: An agroecological perspective. Advances in plant pathology. Vol. II. USA.
- Gong J. G., T. Bramley, and R. Webb. 1991. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. Biol. Reprod. 45:941-9.
- González R., J. C. Velarde, S. Zambrano, y P. Esté. 1997. Producción y transplante de embriones congelados de bovinos Criollo Limonero. Arch. Lat. Prod. Anim. 5: 370-372.
- Hafez, E. S., y B. Hafez. 2002. "Reproducción e Inseminación artificial en Animales". DF., México. 7 ed, McGraw-Hill Interamericana. 542 p.
- Hansen P., J. 2007. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. Theriogenology 68: S242-S249.
- Hasler J. 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. Theriogenology 56: 1401-1415.
- Hernández J. C., C. C. Chase, and P. J. Hansen. 2004. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus Breeds. J. Dairy Sci. 87:53-58.
- Herzog K., M. Brockhan-Lüdemann, M. Kaske, N. Beindorff, V. Pual, H. Niemann, and H. Bollwein. 2010. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. Theriogenology 73: 691-697.
- Hidalgo C. O., E. Gómez, L. Prieto, P. Duque, F. Goyache, L. Fernández, I. Fernández, N. Facal, and C. Díez. 2004. Pregnancy rate and metabolic profiles in cattle treated with propylene glycol prior to embryo transfer. Theriogenology 62: 664-676.
- Houghton P. L., R. P. Lemenager, G. E. Moss, and K. S. Hendrix. 1990. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. J. Anim. Sci. 68: 1428-1437.
- INIFAP-SAGAR, 2012. Transferencia de embriones en Ganado bovino. Tecnologías llave en mano, division pecuaria. 200 p.
- Inskeep, E., K. 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. J Anim. Sci. 82 (13): E24-E39.
- Jones A. L., and G. C. Lamb. 2008. Nutrition, synchronization, and management of beef embryo transfer recipients. Theriogenology 69:107-15.

- Kastelic J. P., and O. J. Ginther. 1991. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Anim Reprod Sci.* 26:13-24.
- Koppel, R. E., G. A. Ortiz, D. A. Ávila, L. D. Lagunas, O. G. Castañeda, y G. I. López. 1999. Manejo de ganado bovino de doble propósito en el trópico. INIFAP.CIRGOC. Libro Técnico Núm. 5. Veracruz, México. 11-37.
- Kuleshova L. L., and A. Lopata. 2002. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertility and Sterility* 78:449-54.
- Kuwayama M. 2007. Highly efficient vitrification for criopreservation of human oocytes and embryos: The CrioTop method. *Theriogenology* 67: 73-80.
- Lake P. E. 1986. The history and future of the cryopreservation of avian germ plasm. *Poultry Sci.* 65: 1-15.
- Ledezma R., M. Camacho, F. Picón, G. Moreno, y J. Zarate. 2011. Efecto del CIDR aplicado en vacas de carne receptoras para transferencia de embriones sobre la tasa de preñez. *Ciencia UANL. Monterrey, México* 14: 281-287.
- Lehn-tensen H., and W. F. Rall. 1983. Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing. *Theriogenology* 19: 263-77.
- Lindner G. M., and R. W. Wright. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20: 407-16.
- Looney C. R., J. S. Nelson, H. J. Schneider, and D. W. Forrest. 2006. Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology* 65: 201-209.
- Lozano D. R. R., M. A. P. Asprón, C. G. P. Vásquez, E. P. Gonzalez, y C. F. F. Aréchiga. 2010. Efecto del estrés calórico sobre la producción embrionaria en vacas superovuladas y la tasa de gestación en receptoras. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 1:189-203.
- Macmillan K. L., and W. W. Thatcher. 1991. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod.* 45: 883-9.
- Mapletoft, R.J. 1980. Embryo transfer for the practitioner. *Proc. 13th Ann. Meet. Am. Assoc. Bovine Pract. Toronto, Canadá.* pp. 154-162.
- Mapletoft, R.J. 1982. Superovulation and recovery of ova from the bovine. *Proc. Owners and Managers Workshop- VII Ann. Meet. IETS, Denver Colorado USA.* pp. 37-47.
- Mapletoft, R. J. 1996. Superovulación en el ganado bovino Resúmenes Segundo Simposio Internacional de Reproducción Animal, Carlos Paz, Córdoba. 69-85.

- Mapletoft R. J., C. E. Lindsell, and V. Pawlyshyn. 1986. Effects of clenbuterol, body condition and non-surgical embryo transfer equipment on pregnancy rates in bovine recipients *Theriogenology* 25: 172.
- Martyniuk, E., and D. Planchenault. 1998. Animal genetic resources and sustainable development in the Europe. 6th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production. 28:35-42.
- Martinez A., and A. Valcárcel. 2008. Vitrificación de embriones bovinos obtenidos *in vitro*. *Reproduction* 23: 23-33.
- Martínez D. 2008. Situación actual de la transferencia de embrionaria. Revisión y actualización. *Frisona Española. A. Coruña* 164: 72-78.
- Martínez, J. P. 2001. El Colegio de Postgraduados en Veracruz: veinte años de interacción académica con la agricultura tropical (1979-1999). Tesis Doctoral. Agroecosistemas Tropicales. Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, México. 195 p.
- Martínez, J. P., C. Landeros, y A. Pérez. 2004. El concepto de agroecosistemas. Un enfoque de cadenas de producción-consumo. Memoria del primer coloquio sobre agroecosistemas y sostenibilidad. Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz. 15 p.
- Martinez M. F., G. P. Adams, D. R. Berfelt, J. P. Kastelic, and R. J. Mapletoft. 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim Reprod Sci.* 57:23-33.
- Molina I., R. Cervera, C. Duque, J. Alfonso y A. Romeu. 2004. Criopreservación de ovocitos humanos. Vitrificación vs. Congelación. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 21: 177- 189.
- Montiel S. M., A. M. Hernández y R. Ponce. 1986. Influencia de algunos factores sobre el comportamiento reproductivo de las bajas en el ganado criollo. *Prod. Animal.* 3: 251-256.
- Morales M. M., J. P. Martínez, G. H. Torres, y J. E. Pacheco. 2004. Evaluación del potencial para la producción ovina con el enfoque de agroecosistemas en un ejido de Veracruz, México. *Téc. Pecu.* 42: 347-359.
- Moreno D., L. Cutaia, L. Villata, F. Ortisi, and G. A. Bo. 2001. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology* 55:1-408.
- Nasser L. F., E. L. Reis, M. A. Oliveira, G. A. Bó, and P. S. Baruselli. 2004. Comparison of four synchronization protocols for fixed time embryo transfer in *Bos indicus* x *Bos taurus* recipients. *Theriogenology* 62: 1577-84.

- Nogueira M. F., D. S. Melo, L. M. Carvalho, E. J. Fuck, L. A. Trinca, and C. B. Moraes. 2004. *Theriogenology* 61: 1283-1290.
- Odde K. G. 1990. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J Anim Sci.* 68: 817-30.
- Orellana J. C. B., y E. M. P. Peralta. 2007. Manual de procedimiento para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and Sexing Technologies. Carrera de Ciencias y Producción Agropecuaria. Zamorano Honduras. 2-56.
- Otoi T., K. Yamamoto, N. Koyama, S. Tachikawa, and T. Suzuki. 1998. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. *Cryobiology* 37: 77-85.
- Oyuela L. A., y C. Jiménez. 2010. Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones. *Med. Vet. Zoot.* 57: 191-200.
- Pariacote, F. A. 2000. Riesgos de extinción del conglomerado nativo de genes bovinos en América Latina. Caso Venezuela. Departamento de producción animal. *Archivo de zootecnia. Venezuela.* 49: 17-26.
- Pereira J. C., S. Carmen, y A. de Lemos. 1981. Estudios de los factores ambientales y genéticos relacionados con el intervalo entre partos de la raza caracú. *Genética y reproducción* 5: 19.
- Petit V. A., and M. Edidin. 1974. Lateral phase separation of lipids in plasma membranes: effect of temperature on mobility of membrane antigens. *Science* 184: 1183-5.
- Pérez, V. A. 2003. Análisis de agroecosistemas: una breve revisión. Colegio de Postgraduados.
- Phillips, C. 2003. Principios de producción bovina. Zaragoza, España. Ed. Acribia S.A. 341 p.
- Pursley J. R., M. O. Mee, and M. C. Wiltbank. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF 2α and GnRH. *Theriogenology* 44:915-923.
- Pursley J. R., M. R. Kosorok, and M. C. Wiltbank. 1997. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J Dairy Sci.* 80:301-6.
- Putney D., M. Drost, and W. Thatcher. 1988. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperature between days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology* 30: 195-209.
- Putney D. J., S. Mullins, W. W. Thatcher, M. Drost, and T. S. Gross. 1989. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient

- temperatures between the onset of estrus and insemination. *Anim Reprod Sci.* 19: 37-51.
- Rall W. F., and G. M. Fahy. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryo at -196°C by vitrification. *Nature* 24: 573-375.
- Rall W. F. 1992. Cryopreservation of embryos and oocytes: Methods and applications. *Animal Reprod. Sci.* 28: 237-245.
- Roa, N. A., T. Linares, y R. Tamasaukas. 1998. Método y aplicaciones de la criopreservación de ocitos y embriones en bovinos y otros mamíferos. Una revisión. Instituto de investigaciones zootécnica. Venezuela.
- Rodríguez C. A., A. A. Teixeira, R. M. Ferreira, H. Ayres, R. F. Mancilha, A. H. Souza, and P. S. Baruselli. 2010. Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. *Anim Reprod Sci.* 118: 110-117.
- Rodríguez M. J., C. E. Giraldo, S. P. Castañeda, T. C. Ruiz, y M. A. Olivera. 2007. Análisis multifactorial de las tasas de preñez en programas de transferencia de embriones en Colombia. *MVZ Córdoba. Colombia.* 12: 978-984.
- Romo G. S. 1993. Biotecnología reproductiva: Avances en ganado bovino. *Vet. Méx.* 24: 177-184.
- Rosales, F. M. 2013. Superovulación en ganado Criollo Lechero Tropical. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Edo. de México 56 p.
- Rosendo, P. A. 1998. Evaluación genética de una población de ganado criollo lechero en el trópico mexicano. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Edo. de México.
- Ruiz, R. O., C. Olguín, M. Álvarez, y P. Fajersson. 2004. El enfoque en agroecosistemas ante los retos sociales. Memoria del primer coloquio sobre agroecosistemas y sostenibilidad. Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, México.
- Ruiz, R. O. 2006. Agroecología: Una disciplina que tiende a la transdisciplina. *Interciencia.* 31-2: 140-145.
- SAGARPA, 2001. Situación actual y perspectivas de la producción de leche de ganado bovino en México 1990-2000. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Centro de Estadísticas Agropecuarias (CEA).
- SAGARPA. 2002. Informe sobre la situación de los recursos genéticos pecuarios (RGP) de México. 50 p.

- SAGARPA. 2010. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2010. Coordinación General de Ganadería. Claridades Agropecuarias. 207: 34-43.
- Santellano E. E., C. Becerril, Y. Mei, D. Gianola, G. Torres, R. Ramírez, J. Domínguez, y A. Rosendo. 2011. Caracterización de la lactancia y evaluación genética del ganado Criollo Lechero Tropical utilizando un modelo de regresión aleatoria. *Agrociencia* 45:165-175.
- Sartori R., M. R. Bastos, P. S. Baruselli, L. U. Gimenes, R. L. Ereno, and C. M. Barros. 2010. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos Indicus* cattle in a tropical environment. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 67: 357-375.
- SAS Institute Inc. 2008. SAS/STAT® 9.2 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Scenna F. N., M. E. Hockett, T. M. Towns, A. M. Saxton, N. R. Rohrbach, M. E. Wehrman, and F. N. Schrick. 2005. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 78: 38-45.
- SE. 2012. Análisis del sector lácteo en México. Secretaría de Economía. Dirección General de Industrias Básicas. 29 p.
- Seidel, G E., and S. M. Seidel. 1991. Training manual for embryo transfer in cattle. FAO Animal Production and Health Paper 77. Roma. 77:164.
- Selk, G. 2002. Embryo transfer in cattle. Cooperative extension service. Division of agriculture. Oklahoma State University. 3158-4
- SIAP, 2013. Boletín de leche enero-marzo de 2013. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 1-64 p.
- Shimohira, I. 1995. Embryo Transfer (ET) and its related techniques in Japan. Proceeding of 1st East Asian Symposium on Animal Biotechnology. Sendai, Japan.
- Spiegel, M. 1969. Teoría y problemas de estadística. José Luis Gómez Espadas. Libros McGraw-Hill. *i.e.* pp 188-216.
- Stroud B., and J. Hasler. 2006. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology* 65(1): 201-9.
- Thatcher W. W., F. Moreira, J. Santos, R. Mattos, F. Lopez, S. Pancarci, and A. Risco. 2001. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 55: 75-89.

- Tovío L. N., A. Duica, y L. Grajales. 2008. Desarrollo embrionario y estrategias antiluteolíticas hormonales en programas de trasplante de embriones bovinos. *Rev. Med. Vet. Zoo. Córdoba*. 13: 1240-1251.
- Wolfenson D., Z. Roth and R. Meidan. 2000. Impaired reproduction in heat stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim Reprod Sci*. 60-61: 535-47.
- Wright J. M. 1981. Non-surgical embryo transfer in cattle. *Theriogenology* 15: 43-56.
- Youngs C. R. 2011. Cryopreservation of preimplantation embryos of cattle, sheep, and goats. *J. Vis Exp*. 54.

ANEXOS

Anexo 1. Gastos generados por receptora en Olinalá Guerrero

Producto	Precio unitario (\$)	cantidad de producto usado por receptora	costo de producto por donadora (\$)
Virbamec Classic 1 L	1,092.00	7 ml	15.2
catosal 500 ml	755.00	20 ml	60.4
mu-se 100 ml	430.00	8 ml	34.4
folligon 5000 UI	920.00	400 UI	55.2
litalize 30 ml	130.00	5 ml	22
CIDR	1,548.00	1 dispositivo	154.8
alimento kg	242.00	3.5 kg	940.5
benzoato de E2 100 ml	140.00	2 ml	14
cipionato de E2 20 ml	85.00	0.5 ml	4.2
agujas	98.00	10	9.8
jeringas	5.00	8	40
xilocaina 50 ml	36.00	5 ml	3.6
funda p/transferir pq/5	232.68	1	46.5
alcohol 1 L	19.5	200 ml	5
servitoallas pq/2	19.00	1	19
yodo espumoso 4L	260.00	100 ml	5.2
yodo solución 4 L	260.00	100 ml	5.2
costo de Embrión	1,500.00	1	1500
transferencia	700.00	1	700
		Total	\$3,634.8

Anexo 2. Gasto generado por receptora en el Colegio de Postgraduados

Producto	Precio unitario \$	cantidad de producto usado por receptora	costo de producto por donadora (\$)
Virbamec Classic 1 L	1,092.00	7 ml	15.3
catosal 500 ml	755.00	20 ml	60.4
mu-se 100 ml	430.00	8 ml	34.4
folligon 5000 UI	920.00	400 UI	55.2
lutalize 30 ml	130.00	5 ml	21.7
CIDR	1,548.00	1 dispositivo	154.8
alimento kg	242.00	1 kg	544.5
benzoato de E2 100 ml	140.00	2 ml	14.0
cipionato de E2 20 ml	85.00	0.5 ml	4.3
agujas	98.00	10	9.8
jeringas	5.00	8	40.0
xilocaina 50 ml	36.00	5 ml	3.6
funda p/transferir pq/5	232.68	1	46.5
alcohol 1 L	19.50	200 ml	5.0
servitoallas pq/2	19.00	1	19.0
yodo espumoso 4L	260.00	100 ml	5.2
yodo solución 4 L	260.00	100 ml	5.2
costo de Embrión	1,500.00	1	1,500.0
transferencia	700.00	1	700.0
		Total	\$3,238.84