

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“Efecto de la Calidad del Cuerpo Lúteo (C.L.) y tiempo de Embrionización
sobre la Tasa de Concepción en Receptoras Bradford con Embriones Angus
en Transferencia Directa”**

TESIS

POR

MIGUEL ARCANGEL LAGUNES ESPINOZA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MEXICO.

NOVIEMBRE DEL 2014.

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**“Efecto de la Calidad del Cuerpo Lúteo (C.L.) y tiempo de Embrionización
sobre la Tasa de Concepción en Receptoras Bradford con Embriones Angus
en Transferencia Directa”**

TESIS

POR

MIGUEL ARCANGEL LAGUNES ESPINOZA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Dr. CARLOS LEYVA ORASMA

ASESOR PRINCIPAL

TORREÓN, COAHUILA, MEXICO.

NOVIEMBRE DEL 2014.

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**“Efecto de la Calidad del Cuerpo Lúteo (C.L.) y tiempo de Embrionización
sobre la Tasa de Concepción en Receptoras Bradford con Embriones Angus
en Transferencia Directa”**

TESIS

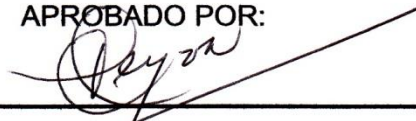
POR

MIGUEL ARCANGEL LAGUNES ESPINOZA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

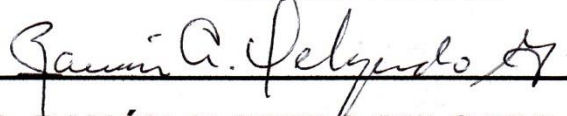
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADO POR:



Dr. CARLOS LEYVA ORASMA

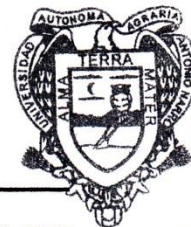
ASESOR PRINCIPAL



MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

Coordinador de la División
Regional de Ciencia Animal

COORDINADOR DE LA DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**“Efecto de la Calidad del Cuerpo Lúteo (C.L.) y tiempo de Embrionización
sobre la Tasa de Concepción en Receptoras Bradford con Embriones Angus
en Transferencia Directa”**

TESIS

POR

MIGUEL ARCANGEL LAGUNES ESPINOZA

QUE SE SOMETE A CONSIDERACION DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADO POR



Dr. CARLOS LEYVA ORASMA

PRESIDENTE



MC. JUAN LUIS MORALES CRUZ.

VOCAL



MVZ CARLOS RAMÍREZ FERNÁNDEZ

VOCAL



Dr. MARCO ALFREDO HERNÁNDEZ VERA

VOCAL SUPLENTE

TORREÓN, COAHUILA, MEXICO.

NOVIEMBRE DEL 2014.

Dedicatorias.

A dios

Por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis padres

Esteban Máximo Lagunes López y Luz María Espinoza Grajales, primeramente gracias por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y porque siempre me apoyaron en todo momento, por sus consejos, por su ejemplo de perseverancia y constancia, por sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, por ser la persona que me enseñó a ser quien soy, pero más que nada, por su amor incondicional. Papitos gracias por darme una carrera para mi futuro, todo esto se los debo a ustedes los quiero.

A mis hermanas:

Ana Luz y Rebeca por estar a cada momento conmigo y apoyarme siempre, las quiero mucho.

A mis familiares:

Abuelos, Tíos, Padrinos, Primos, gracias por brindarme cariño y apoyo gracias por estar conmigo a cada momento los quiero mucho.

Agradecimientos.

A mi alma mater

Por darme la formación profesional necesaria para enfrentar los problemas de la vida profesional.

A mis asesores

Dr. Carlos Leyva Orasma, MC. Juan Luis Morales Cruz, MVZ. Carlos Ramírez Fernández y Dr. Marco Alfredo Hernández Vera. Por la orientación y ayuda que me brindaron para la realización de esta tesis, por su apoyo y amistad que permitieron aprender mucho más que lo estudiado en el proyecto.

A mis profesores

A quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias a su paciencia y enseñanza y finalmente un eterno agradecimiento a esta prestigiosa universidad la cual abre sus puertas a jóvenes como nosotros, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien.

A mis amigos(a)

A todos mis amigos(a) y compañeros(a) de la carrera, en cada uno de ustedes hay una persona muy especial. He aprendido y disfrutado con ustedes mis horas de estudio, gracias por la ayuda cuando en ocasiones me he sentido solo y perdido, gracias por esa bonita amistad sincera. Los voy extrañar.

Índice.

Dedicatorias	i
Agradecimientos	ii
Resumen	v
Palabras Clave	v
I. Introducción	1
Objetivos	2
Hipótesis	2
II. Recopilación Bibliográfica	3
2.1 Situación actual de la transferencia de embriones congelado con etilenglicol	3
2.1.1 Transferencia de embriones	3
2.1.2 Congelamiento de embriones	4
2.1.3 Criopreservación	5
2.1.4 Crioprotectores	6
2.1.5 Etilenglicol	8
2.1.6 Transferencia directa	9
2.1.7 Protocolo de congelación con etilenglicol	10
2.1.8 Formas de identificación de las pajillas	14
2.2 Comparación de la tasa de gestación con embriones congelados con diferentes crioprotectores y embriones frescos	15
2.3 Factores que afectan la tasa de concepción en embriones con transferencia directa	16
2.3.1 Calidad del cuerpo lúteo	18
2.3.2 Tiempo utilizado en la transferencia (habilidad del técnico)	21
2.3.3 Lugar de depósito del embrión	22

2.3.4 Otros	23
2.3.4.1 Aspectos esenciales de la receptora	23
III. Materiales y Métodos	24
3.1 Ubicación del experimento	24
3.2 Animales experimentales	24
3.3 Variables a analizar	25
3.4 Análisis estadístico	25
IV. Resultados y Discusión	26
V. Conclusión	30
VI. Referencias	31

Resumen

En este estudio se Valoró el efecto de la calidad del Cuerpo Lúteo (C.L.) y el tiempo de demora de embrionización sobre las tasas de concepción en receptoras Bradford en Transferencia Directa. El experimento se realizó en Cuatro Ciénegas Coahuila. El rancho cuenta con ganado especializado en producción de carne de las razas Bradford y Angus. Se utilizaron receptoras Bradford, vaquillas que fueron sincronizados y preparados previamente para recibir un embrión congelado, la sincronización fue a base de progestágenos y prostaglandina. Se detectó y se anotó el día y la hora del celo tomándolo como base para la transferencia embrionaria que fue 7 días posteriores a este. El crioprotector a base de Etilenglicol el cual fue descongelado en agua al baño maría a 35°C durante 15-20 seg. La transferencia se realizó 7 días posteriores al celo colocándose el embrión en el mismo lado en donde se detectó el cuerpo lúteo. Se transfirieron las receptoras con presencia de cuerpo lúteo de calidad 2 y 3. El diagnostico de gestación se realizó por palpación rectal 40 días posteriores a la transferencia embrionaria. Obteniendo un 29% de preñez con CL2 y un 25% con CL3. En cuanto al Tiempo de Embrionización (minutos) se clasifico de 0:00-2:59 y más de 3:00 obteniendo porcentajes de preñez de 24 y 30 respectivamente. A pesar que en la literatura internacional la calidad del cuerpo lúteo y el tiempo utilizado en la embrionización se mencionan como factores importantes que afectan la tasa de gestación de la receptora, en este trabajo no encontramos diferencias estadísticas que avalen este planteamiento.

Palabras Clave

Bovinos, Transferencia de Embriones, Etilenglicol, Cuerpo Lúteo, Embrionización.

I. Introducción

La transferencia de embriones (TE) en Norteamérica se desarrolló en los principios de los años setenta con la introducción de razas continentales. En los últimos 30 años la aplicación de esta tecnología ha ido en aumento (especialmente en el ganado lechero), con más animales seleccionados por su genética que por un fenotipo deseable.

Una de las biotecnologías reproductivas que se realizan en la mayoría de países del mundo en ganado bovino es la Transferencia de Embriones, en donde ha tenido un desarrollo vertiginoso en los últimos años. La TE, cuyo objetivo central es el aumento de la descendencia de reproductores de alto valor genético, en especial de las hembras, incluye la aplicación de esquemas de súper ovulación (SOV) en las vacas donadoras de embriones y de sincronización del celo tanto en las hembras donadoras como en las hembras receptoras.

En el presente estudio se transfirieron embriones de alto valor genético (Angus) con el fin de mejorar la calidad genética en bovinos productores de carne.

Objetivos

Valorar el efecto de la calidad del Cuerpo Lúteo (C.L.) y el tiempo de demora de embrionización sobre las tasas de concepción en receptoras Bradford con Transferencia Directa.

Hipótesis

La tasa de concepción en receptoras Bradford con embriones para transferencia directa, depende entre otros factores de la calidad del C.L. y del tiempo utilizado para la embrionización.

II. Recopilación Bibliográfica

2.1 Situación actual de la Transferencia de Embriones congelado con Etilenglicol

2.1.1 Transferencia de Embriones

Mapletoft y Hasler (2005), mencionan que la primera transferencia de embriones en mamíferos realizada con éxito fue hecha por Walter Heape en 1890. Durante un período de unos treinta años, la TE en bovinos se ha convertido en un gran negocio internacional. La tecnología está bien establecida, y más de 500.000 embriones se producen anualmente de vacas superovuladas en todo el mundo.

En México se inicia en los años setentas con un gran interés comercial principalmente en bovinos, en 1973 se realiza la primera transferencia exitosa de un embrión congelado y hoy en día se realizan cientos de miles de obtenciones y transferencias en todo el planeta (Arriaga, 2010).

La TE nos ayuda a acelerar el progreso genético, ya que al aumentar el número de embriones y terneros se puede determinar el potencial genético de la hembra. La eficiencia de los programas de selección y cruzamiento aumentan considerablemente con la aplicación de la TE (Ariza *et al.*, 2006).

Otros autores mencionan, que el aumento en la cantidad de embriones producidos suele estar acompañado de la implementación de nuevos esquemas de superovulación (SOV) de las hembras donadoras y la sincronización de las hembras receptoras (Bolívar y Maldonado, 2008; Bolívar, 2010). La respuesta superovulatoria es una de las variables de mayor importancia en el éxito de un programa de TE (Palma y Brem, 2004). Uno de los principales inconvenientes que posee la técnica de TE es la detección de celos en las receptoras, sobre todo en animales Bos Indicus (Irouléguy, 2009).

2.1.2 Congelamiento de Embriones

Durante muchos años fue imposible congelar con éxito los embriones de mamífero, ya que su gran tamaño impedía que los diferentes procedimientos de congelamiento pudiera evitar la formación de cristales de hielo intracelulares, los cuales resultan letales (Martínez, 2006).

Según De la Fuente (2004), la congelación constituye un proceso físico-químico gobernado por el calor y el transporte de sustancias entre las células y su medio externo. Para controlar estos factores se han utilizado una serie de compuestos crioprotectores con características similares

Una técnica importante tanto en el ámbito comercial como en el científico durante los últimos 20 años, ha sido la producción de embriones bovinos ya que esta ha crecido de forma progresiva, en especial, en el área de la producción in vitro (PIV). La necesidad de conservar los embriones

excedentes de dicha producción, ha impulsado la investigación hacia el desarrollo de nuevos métodos de criopreservación de esta clase de embriones y que por los métodos convencionales de congelamiento, no han alcanzado tasas de sobrevivencia satisfactorias, debido a sus características físicas. Dentro de las nuevas aplicaciones de la criobiología, el método de la vitrificación se muestra como alternativa para mejorar la sobrevivencia de los embriones producidos in vitro, este método con curvas de enfriamiento superiores a las de congelamiento, va a permitir la reducción del tiempo de exposición del embrión en los puntos críticos de temperatura, disminuyendo así los daños térmicos y mecánicos causados durante la formación de hielo y aumentando la viabilidad de los embriones, posterior a su vitrificación. No obstante, es importante resaltar que, a pesar del alcance conseguido con esta técnica hasta hoy, aún es necesario el desarrollo de nuevos métodos y la búsqueda de nuevas perspectivas que optimicen la vitrificación de embriones producidos in vitro (Giraldo *et al*, 2012a).

2.1.3 Criopreservación:

Según Gil (2011), la criopreservación consiste en la conservación de material celular, tejidos u órganos a temperaturas bajas, normalmente a temperatura del nitrógeno líquido (N₂L; -196°C), para detener completamente las reacciones biológicas, teniendo como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad de éstos

En relación con la criopreservación de embriones bovinos producidos in vitro se facilita el uso de programas de transferencia de embriones, el establecimiento de bancos de germoplasma con acceso permanente a

material genético de un determinado individuo o raza, e igualmente facilita las biotecnologías asociadas como clonación y transgénesis. En materia de criopreservación, el desarrollo de tecnologías en la última década ha sido significativo. Una muestra de tales avances la constituye el campo de la reproducción en donde se ha hecho rutinario abordar el proceso de criopreservación de semen, oocitos, embriones o tejido gonadal con el fin de satisfacer la demanda cada vez más creciente por los métodos y servicios de la reproducción asistida. El valor de la criopreservación en la reproducción asistida en bovinos queda claramente ilustrado por el gran número de gametos y embriones que son congelados y transferidos cada año. No obstante, es necesaria la búsqueda de protocolos de vitrificación en los que se evalúen combinaciones de crioprotectores que permitan mejorar la viabilidad embrionaria (Giraldo *et al*, 2012b).

Por otra parte Atencio *et al*. (2014), dicen que la crioconservación es una técnica que permite mantener a bajas temperaturas (-130 °C), a cualquier conjunto biológico de células por tiempo indefinido, creando las condiciones necesarias para que conserven la capacidad de sobrevivir después de la descongelación. Sin embargo, en este proceso se producen daños a las células espermáticas crioconservadas, ocasionados por la formación de hielo intracelular y desequilibrio osmótico. La magnitud de daños criogénicos, durante la congelación y descongelación puede resultar en la disminución de la movilidad con reducción de velocidad espermática y la fertilidad.

2.1.4 Crioprotectores

La función de los crioprotectores es la de proteger a las células de lesiones producidas por la congelación. Existen muchos tipos de crioprotectores que se agrupan según la posibilidad de penetración o no de las membranas celulares. Los más utilizados son: Glicerol, Dimetil sulfoxido (DMSO), Etilenglicol, 1,2 Propanediol entre otros (Arriaga, 2010; Gil, 2011; Martin y Monge, 2012).

Según Belascoain *et al.* (2010), para la congelación de embriones se utilizan dos tipos de crioprotectores:

- Permeables o intracelulares: De bajo peso molecular, Glicerol (G), Dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etanol y otros alcoholes; todos estos compuestos deshidratan la célula penetrando a ésta para ayudar a proteger el citoplasma.
- Impermeables o extracelulares: De alto peso molecular, polivinilpirrolidona (PVP), glucosa, fructosa, ficol, dextrano sorbitol, sacarosa, lactosa, trealosa, rafinosa y otros azúcares. Estos compuestos extraen el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar a la célula; son efectivos para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas a baja actividad de agua.

La alternativa para minimizar los daños criogénicos, es la adición de sustancias que remplacen el agua dentro de la célula, denominadas crioprotectores. Los crioprotectores tienen como propósito mantener la viabilidad celular, previniendo el daño celular durante el proceso de congelación y descongelación (Atencio *et al.*, 2014). El tipo de crioprotector usado, sus posibles combinaciones y su concentración son variables del proceso de vitrificación, que influyen directamente sobre las tasas de supervivencia de los embriones. La dimetilformamida (DMF) es un crioprotector permeable perteneciente al grupo de las aminas, y se considera que por su bajo peso molecular este crioprotector puede ser más fácilmente absorbido por los embriones y menos tóxico en el proceso de vitrificación. Estas características proponen a la DMF como alternativa de ser usada como crioprotector intracelular en la vitrificación de embriones bovinos y evaluar su efecto sobre la viabilidad, determinada a través de la reexpansión del blastocele (Giraldo *et al.*, 2012b).

2.1.5 Etilenglicol:

La utilización del etilenglicol como crioprotector permitió desarrollar la técnica de transferencia directa de embriones congelados/descongelados (procedimiento similar a la inseminación artificial), posibilitando la aplicación de esta técnica en condiciones de campo, sin necesidad de remover el o los crioprotectores utilizados (Mucci *et al.*, 2006). Según Arriaga (2010) el uso del Etilenglicol 1.5 M como crioprotector, proporciona una importante ventaja frente al glicerol, dado que no es necesario el uso de sacarosa para extraer al crioprotector y los embriones pueden ser transferidos directamente, ya que los embriones volverán a su estado original al contacto con el medio intrauterino.

La criopreservación por vitrificación con el uso de crioprotectores como el etilenglicol (EG), ha favorecido el mejoramiento de la eficiencia en la preservación de células germinales y embriones de varias especies dado que permite el aumento de la velocidad de enfriamiento, así como la disminución de los efectos osmóticos y tóxicos y las alteraciones a nivel celular (Gómez *et al*, 2010). El EG es un agente crioprotector permeable, de bajo peso molecular que se ha usado en los protocolos de criopreservación de semen en las diferentes especies. El etilenglicol puede ser una alternativa para los protocolos de criopreservación de semen. Se ha demostrado un mejor efecto protector del etilenglicol en comparación con el glicerol en otras especies como humanos, equinos, bovinos y chinchillas. Así mismo otros estudios indican que el etilenglicol tiene un efecto similar al glicerol y por lo tanto puede sustituirlo (Ramónez, 2013).

2.1.6 Transferencia directa

Giraldo *et al.* (2012a), mencionan que el congelamiento convencional tiene una ventaja comparativa frente a los otros métodos de criopreservación, al ser una metodología que permite la utilización de bajas cantidades de crioprotectores y la transferencia directa de los embriones después del descongelamiento. Sin embargo, su habilidad para prevenir la formación de hielo aún es limitada, y sus resultados en la criopreservación de embriones *in vitro* han sido variables, y menores en comparación con los datos obtenidos en embriones *in vivo*. La razón por la cual existe esta variación en la viabilidad de los embriones producidos *in vitro*, en comparación con los producidos *in vivo*, es debida probablemente a las características físicas

propias de este tipo de embriones, que hacen que sean más sensibles al momento de ser expuestos a bajas temperaturas.

Otro autor menciona que el método de transferencia directa, por etilenglicol, crioprotector que tiene un menor peso molecular que el glicerol y por lo tanto, resulta más permeable con lo que provoca pequeños cambios de volumen celular (Ochoa, 2011). En otro experimento llevado a cabo en 2007 se obtuvo un porcentaje de preñez de 22% cuando las pajuelas fueron descongeladas y transferidas en forma directa (Colazo y Mapletoft, 2007).

En 2004, Bo *et al.*, llevaron a cabo una investigación en TE directamente donde utilizaron como receptoras vacas y vaquillas de la craza índica que fueron sincronizadas con dos dosis de 25 mg de dinoprost (Lutalyse, Romage, Argentina) aplicadas con 14 días de intervalo. A los 7 días del celo, todas aquellas receptoras con un CL (determinado por palpación rectal) recibieron un embrión en el cuerno uterino ipsilateral al CL los embriones fueron descongelados en agua a 28-30 °C y transferidos directamente al útero sin remoción del crioprotector (método de transferencia directa). Del cual obtuvieron un 47 % de preñez.

2.1.7 Protocolo de congelación con Etilenglicol

En relación al uso del Etilenglicol Filipiak y Larocca (2012) mencionan su utilización como un crioprotector de uso práctico. Este posee un alto coeficiente de permeabilidad celular de tal forma que los embriones después de descongelada la pajuela se implantan directamente por tanto no existe la

expansión por sobre hidratación con posterior muerte embrionaria que se observa en el caso del glicerol o del DMF. La posibilidad de estandarizar un método de criopreservación con una tasa aceptable de gestación que permita transferir los embriones congelados directamente a las receptoras luego de la descongelación constituirá sin duda alguna en el método de elección universal. El método con etilenglicol tendría la ventaja de una mayor practicidad a nivel de la producción ya que permite implantar en forma directa el embrión una vez descongelada la pajuela a 30 grados, a condición de que la transferencia se realice dentro de los 10 minutos siguientes a la descongelación.

Técnica:

1. El embrión una vez lavado por sucesivos pasos en PBS con 20% de SFb, se mantiene 20 minutos en una concentración de 1.8 M de etilenglicol (10%v/v), en PBS +20% de SFb.
2. Se aspira en una pajuela de 0.25 ml de manera que quede una columna de PBS-EG separada de 2 columnas de PBS isotónico a través de 2 pequeñas burbujas de aire.
3. Inmersión de la pajuela directamente a -7°C utilizando la maquina programable con alcohol metílico.
4. Inducción manual de cristales de hielo en el medio extracelular (seeding) a -7°C manteniendo 10 minutos a esa temperatura para permitir el equilibrio de las soluciones.
5. Descenso de la temperatura a una velocidad de $0.3^{\circ}\text{C}/\text{minutos}$ hasta alcanzar los -30°C .
6. Se equilibra 15 minutos.
7. Se sumerge la pajuela en N_2 líquido.

8. Descongelación: se descongela la pajueta a baño maría a 30°C durante 20 minutos.
9. Implante: se realiza la transferencia por el método no quirúrgico inmediatamente en receptoras sincronizadas al estado del desarrollo del embrión a implantar. No deben pasar más de 10 minutos entre la descongelación de la pajueta y el implante en la receptora. El máximo es 20 minutos, debido a que el etilenglicol es más tóxico que el Glicerol. Son de destacar los resultados de nuestro laboratorio (Filipiak y Larocca, 2012.)

Por otra parte De Luca (2002), presenta el siguiente método:

- 1) Selección del embrión. Separar mórulas de blastocistos.
- 2) Lavar 10 veces con una solución de Dulbecco modificado, con 10% de suero fetal bovino.
- 3) Mórulas: sumergir durante 10 minutos el embrión en una solución de Dulbecco, con 1,5 molar de glicerol, más 0,1 molar de sucrosa. Blastocistos: sumergir durante 10 minutos el embrión en una solución de Dulbecco, con 1,5 molar de glicerol, más 0,2 molar de sucrosa.
- 4) Tomar una pajueta de 0,25cc y cargar en ella el embrión en el siguiente orden:
 - a) 1ra. columna de Dulbecco con suero fetal al 10%.
 - b) 2da. columna, pequeña burbuja de aire.
 - c) 3ra. columna de Dulbecco con medio de congelación.
 - d) 4ta. columna, pequeña burbuja de aire.
 - e) 5ta. columna, cargar el embrión en su medio.
 - f) 6ta. columna, pequeña burbuja de aire.
 - g) completar el resto de la pajueta con medio de congelación.

- 5) Llevar los embriones a la congeladora con una temperatura de entre -6°C a -7°C , donde permanecerán 10 minutos en stand by.
- 6) A su término tocar la pajuela a la altura de la 3ra. columna con una pinza hemostática, previamente sumergida en nitrógeno líquido para que alcance en su extremo los -196°C . Este método (Seeding) evitará la muerte del embrión por sobrefusión.
- 7) La corrida de temperatura será de $0,5^{\circ}\text{C}$ por minuto hasta alcanzar los -35°C , momento en que se introducirá la pajuela en nitrógeno líquido

Otro ejemplo es el de Bo *et al.* (2004), que mencionan el siguiente método después de la colección todos los embriones son lavados 10 veces con albúmina sérica bovina (Holding Media, ABTechnology, USA) y son evaluados y clasificados. Todos los embriones Grado 1 ($n=634$) y Grado 2 ($n=198$) en estadio de mórulas a blastocistos expandidos se colocan en una solución con 1,5 M de EG (Vigro Plus, ABTechnology, USA) o 1,5 M de EG más 0,1 M de S (EG+S; Vigro Plus, ABTechnology, USA) durante 7 a 10 minutos y son cargados en pajuelas de 0,25 ml. Se colan en la congeladora de embriones (CL 5000, Freeze Control, Australia) a $-6,5^{\circ}\text{C}$, se induce la formación de cristales extra celulares y luego de 10 minutos de estabilización son congelados a $0,6^{\circ}\text{C}$ por minuto hasta alcanzar los -35°C . Inmediatamente después son introducidos en nitrógeno líquido (-196°C) para su almacenamiento hasta el momento de la transferencia a las vacas receptoras.

Según Vásquez *et al.* (2011), mencionan estos métodos utilizando dos soluciones, una solución de equilibrio (5% glicerol + 5% etilenglicol + 0.2 M sucrosa + 10% suero fetal bovino + 50 ug/ml gentamicina) a 25°C , donde el

embrión permanece por 5 min, y una solución de vitrificación (20% glicerol + 20% etilenglicol + 0.5 M sucrosa + 10% suero fetal bovino + 50 ug/ml gentamicina) donde se mantiene al embrión por 1 min. El embrión se coloca en pajuelas de 0.25 ml (1 embrión por pajuela) y es sumergido de inmediato en el nitrógeno líquido.

Simultáneamente en el método de congelación lenta los embriones se colocan en solución de congelación (10% etilenglicol + 10% SFB + 50 ug/ml de gentamicina) a 26 °C durante 5 min y envasados en pajuelas de 0.25 ml. El descenso de temperatura se realiza en una tasa de 0.12 °C/ min en 3 horas, luego a 5 °C hasta -20 °C, y finalmente se sumergieron las pajuelas en el nitrógeno líquido (Vásquez *et al*, 2011).

2.1.8 Formas de identificación de las pajillas

Orellana y Peralta (2007), muestran una forma de identificación de las pajillas cuando están en el proceso de congelamiento en el equipo, se debe preparar las etiquetas con la respectiva información. A continuación se presenta un ejemplo de la información que debe contener.

(1 DT 1279 AN 14763076 N256 AN 14542822 SUM. PFRED ON12 1 EMB. 4-1 07MR14)

- Número de la pajilla (1)
- Tipo de solución que se utilizó para el congelamiento. Por ejemplo DT: si es en congelado en etilenglicol.
- Número del laboratorio que realiza T.E. (registro: 1279).
- Raza (AN: Angus).

- Número de registro de la vaca (14763076).
- Nombre de la vaca (N256).
- Raza de la vaca (AN: Angus).
- Número de registro del toro (14542822).
- Nombre del toro (opcional, por ejemplo SUM. PFRED ON12).
- Número de embriones.
- Grado y calidad del embrión.
- Fecha de colecta y congelamiento (Orellana y Peralta, 2007)

2.2 Comparación de la tasa de gestación con embriones congelados con diferentes crioprotectores y Embriones Frescos

Según Diez (2003), presenta este cuadro de recopilación de diferentes trabajos que realizaron algunos investigadores con diferentes crioprotectores como lo es: glicerol, sacarosa, etilenglicol, ficoll entre otros mostrándonos unas variaciones en los % de gestación.

	Crioprotector	Dilución	% Gestación
Congelación lenta			
Reichenbach y col., 1991	1,36 M Gly	4 etapas	11,3 (28/248)
Kajihara y col., 1992	10% Gly + 0,2M Sac	1 etapa	38 (327/866)
Massip y col., 1987	1,36 Gly + 0,25M Sac	1 etapa	23 (4/17)
Wurth y col., 1994	1,2M Gly	4 etapas	14 (5/35)
Hasler y col., 1995	1,36M Gly	3 etapas	35 (34/97)
Van Langendonck y col, 1994	10% Gly	1 etapa	59 (20/34)
Vitrificación			
Wurth y col., 1994	6,5M Gly + 6% w/v BSA	2 etapas	24 (20/85)
Agca y col., 1994	10% Gly + 20% EG	1 etapa	50 (8/16)*
Delval y col., 1995	40%EG + 18% Ficoll + 0,3M Sacarosa	1 etapa	66,6 (8/12)*
Van Langendonck y col, 1994	6,5M Gly + 6% w/v BSA	1 etapa	43 (17/40)
* transferencia de 2 embriones/receptora			

Fig. 1. Porcentajes de Gestación con diferentes crioprotectores (Tomado de Diez, 2003).

Colazo y Mapletoft (2007), llevaron a cabo un experimento en el cual obtuvieron un porcentaje de preñez promedio de 31%. El porcentaje de preñez más alto fue (43%) obtenido cuando un grupo de embriones fue congelado en una pajuela y después del descongelado, se transfirieron solamente los embriones de mejor calidad. Cuando las pajuelas fueron descongeladas y transferidas en forma directa sin tomar en cuanto la calidad del embrión el porcentaje de preñez fue del 22%.

2.3 Factores que afectan la tasa de concepción en embriones con transferencia directa

Capitaine (2005), define la tasa de preñez como la velocidad con la que se preñan las vacas y el índice más objetivo para monitorear la reproducción en primera instancia. Es el primer indicador que refleja la eficacia del sistema en forma global e integral. La Tasa de preñez se mide cada 21 días (1 ciclo estral) y representa la proporción de vacas que se preñan en 1 ciclo. Cuando se habla de Tasa de Preñez anual se está haciendo referencia al promedio ponderado de los 17 o 18 ciclos que tiene un año (21 días cada uno).

La fertilidad es la expresión de un conjunto de aspectos biológicos y ambientales que favorecen o impiden la fecundación y el desarrollo temprano de la gestación (Ortega *et al.*, 2010). La fertilidad de la vaca lechera comúnmente es medida calculando el porcentaje de vacas que conciben luego de una única inseminación (IA), también conocido como tasa de concepción. Las revisiones de la literatura científica vinculada con la fertilidad de las vacas lecheras revelan una tendencia a una disminución en la tasa de concepción en los hatos de EE.UU. y de otras partes del mundo. Los cuatro

factores que determinan la tasa de concepción en un hato lechero son: 1) la fertilidad de la vaca, 2) la fertilidad del toro, 3) la exactitud en la detección de los celos y 4) la eficiencia en la IA. (Fricke, 2005).

La tasa de concepción también es ampliamente afectada por la precisión de la detección de celos, la técnica de inseminación y manejo del semen, fertilidad del semen utilizado, nivel nutricional de las vacas, estado corporal y cambio del mismo, entre mucho otros (Capitaine, 2005).

Se considera que las bajas tasas de preñez, cuando se transfieren embriones de buena calidad, podrían estar relacionados con la raza de la receptora, grado de sincronía entre el desarrollo del embrión y la receptora y calidad del CL. La raza de la receptora ejerce algún tipo de efecto con respecto al tamaño del CL lo cual puede estar ejerciendo un efecto sobre la tasa de concepción. Generalmente se prefieren razas cruzadas antes que las puras y se prefieren animales de origen lechero, particularmente si se trata de vacas o vaquillas jóvenes (Anchondo *et al.*, 2009).

Otros autores mencionan que los factores que podrían afectar los resultados de las tasas de preñez en TE tienen diversos orígenes. Los clasifican en intrínsecos y extrínsecos.

Extrínsecos: ambientales, factores de manejo y administrativos y nutricionales (deficiencia y tóxicos) patológicos, e inmunológicos.

Intrínsecos: diámetro del cuerpo lúteo, factores asociados al embrión (estado de desarrollo, genéticos,), toros, dificultad al momento de la transferencia (Oyuela y Jimenez, 2010).

En México, Medrano *et al.* (2013), indican tasas de concepción entre 35 a 65%, dependiendo de la calidad de embriones transferidos y de la habilidad del operador para realizar la TE.

2.3.1 Calidad del Cuerpo Lúteo

Antes de la transferencia deberá ser evaluada la presencia de un cuerpo lúteo. Parece razonable considerar la calidad del CL, a partir de su tamaño y consistencia, como un factor asociado al éxito en la selección de receptoras (Palma, 2004). En cuanto a la calidad del C.L se menciona que las concentraciones bajas de progesterona (P_4) en plasma, al momento de la transferencia, son un reflejo de una función lútea subnormal, que puede estar influenciada por una asincronía debida a la mala detección de calores y/o inadecuada sincronización de los animales, o por folículos ovulatorios de menor tamaño del normal, lo que produce un cuerpo lúteo de baja funcionalidad (Rodríguez *et al.*, 2007)

Duran y Ortiz (2010), presentan la siguiente clasificación de los Cuerpos Lúteos (CL) por tamaño, considerando el área al momento de la palpación rectal:

- CL1 (> 2,0 cm²)
- CL2 (1,5 a 2,0 cm²)

➤ CL3 (< 1,5 cm2)

Otros autores mencionan que el tamaño del cuerpo lúteo el día de la transferencia del embrión, vía palpación rectal de la siguiente manera:

- Cuerpo lúteo 1 (CL1): cuerpo lúteo blando, no mayor a 1 cm de diámetro.
- Cuerpo lúteo 2 (CL2): cuerpo lúteo blando, de 1 a 2 cm de diámetro.
- Cuerpo lúteo 3 (CL3): cuerpo lúteo de más de 2 cm de diámetro (Marín, 2012).

Según Cutini *et al.*, (2000) considerar la calidad del cuerpo lúteo a partir de su tamaño y consistencia, como un factor asociado al éxito en la selección de las receptoras parece razonable; sin embargo, no es posible establecer una relación entre la calidad del cuerpo lúteo y la preñez. También dicen que es aceptado que existen factores más importantes a tener en cuenta para descartar o seleccionar una receptora. Entre ellos, haber observado el celo y comprobado la presencia de un cuerpo lúteo funcional, cualquiera fuese su calidad. Probablemente, el empleo de la ecografía y el análisis computarizado de imágenes aportarán en un futuro próximo nuevas herramientas para mejorar la clasificación del cuerpo lúteo.

Por otra parte, Oyuela (2009) menciona lo siguiente la evaluación del cuerpo lúteo se realiza por palpación rectal, para identificar en qué ovario se encuentra localizado. De manera adicional se realiza ultrasonido para verificar la presencia del mismo y para determinar el diámetro (cm) de las estructuras presentes en los ovarios. Los cuerpos lúteos son agrupados en

tres categorías dependiendo de su diámetro de la siguiente manera: con base en las experiencias de la finca en ganado cebuino y sus cruces:

- 0= Cuerpo lúteo de menos de 10 mm de diámetro.
- 1= Cuerpo lúteo de 10 a 15 mm de diámetro.
- 2= Cuerpo lúteo de más de 15 mm de diámetro (Oyuela, 2009).

La progesterona es indispensable para el establecimiento y el mantenimiento de la preñez. No obstante, fueron infructuosos los intentos de seleccionar a las receptoras en base al nivel de dicha hormona al momento de la transferencia dado que éste, no se correlacionó con el porcentaje de preñez. Además, se ha observado en las receptoras que la repetibilidad de los niveles de progesterona en el día 7 del ciclo estral es baja (Cutini *et al*, 2000).

De manera similar otros autores mencionan que el cuerpo lúteo presente al momento de la implantación del embrión juega un papel importante en los resultados de la transferencia de embriones ya que se espera que secreta suficiente cantidad de progesterona para el mantenimiento de la preñez del embrión transferido. La progesterona es secretada por el cuerpo lúteo que se forma en el mismo sitio del ovario donde ocurrió la ovulación que produjo la preñez, ayuda en el establecimiento y mantenimiento de la misma, y a que se produzca un parto exitoso. Debido a la importancia del cuerpo lúteo en la preñez, diferentes autores han buscado optimizar este factor ya sea asegurando la formación del mismo, buscando un buen tamaño o estimulando la formación de varios cuerpos lúteos. Con el objeto de elevar la tasa de concepción, usó diferentes estrategias farmacológicas consistentes en el uso de hCG, GnRH o LH al día 7 después del estro induciendo la

formación de cuerpos lúteos accesorios por luteinización de los folículos dominantes o ejerciendo un efecto luteotrópico adicional propio de la hCG, que estimula la producción de progesterona (Oyuela y Jiménez, 2010).

2.3.2 Tiempo utilizado en la Transferencia (habilidad del técnico)

El hecho de depositar un embrión en el interior del cuerno uterino supone una invasión del tracto reproductivo; este procedimiento está asociado a posibles lesiones del endometrio y a la consecuente producción de PGF2-alfa, lo que reduciría los índices de preñez (Oyuela y Jiménez, 2010; Marín, 2012). Un factor a tener en cuenta en la transferencia a las receptoras es el factor humano, de tal manera que las tasas de fertilidad variaron del 20% al 67% según la habilidad de cada técnico (De la Fuente, 2004).

Por eso es de gran importancia que esté compuesto por un personal idóneo y con experiencia. Se evidencian diferencias significativas en los resultados, representados en tasa de preñez, después de realizar TE, por diferentes operarios que aplican esta técnica, también evaluando la calificación de la transferencia (Buena, regular, mala) en un grupo experimental. De esta manera la aplicación de la técnica afecta directamente la eficiencia en un programa de TE (Duica, 2010).

Solórzano *et al.* (2008), dice que la descongelación del embrión se efectúa en un paso manteniendo la pajilla al aire, a temperatura ambiente por 7 seg. posteriormente se sumerge en baño de agua a 35 °C durante 10 seg. El

glicerol es extraído en un paso en solución de sacarosa. Finalmente el embrión es colocado en un medio de mantenimiento hasta ser transferido.

El tiempo que insume atravesar el cérvix y colocar el embrión en el cuerno uterino se correlaciona negativamente con el porcentaje de preñez (Cutini *et al.*, 2000).

2.3.3 Lugar de depósito del Embrión

Según Ávila (2004); Cutini *et al.* (2000), la transferencia de embriones es una técnica mediante la cual, los embriones (óvulos fertilizados) son colectados del cuerno uterino de la hembra antes de la nidación (donadora), y transferidos al cuerno uterino de otras hembras para completar su gestación (receptoras).

La técnica de transferencia de embriones (TE) permite seleccionar animales de alta producción y adecuada adaptabilidad ambiental para mejorar la calidad genética e incrementar el número de crías en el hato (Medrano *et al.*, 2013).

2.3.4 Otros

2.3.4.1 Aspectos esenciales de la receptora

Las receptoras forman una parte esencial del programa de TE y también uno de los problemas más serios. Las buenas receptoras son caras, su mantenimiento costoso y su estado de salud es crítico para el éxito de la TE. Desde el punto de vista reproductivo una buena receptora es la hembra capaz de recibir un embrión y llevarlo a término. Más aún, la receptora deberá ser capaz de parir sin grandes dificultades y luego alimentar al ternero de manera que le permita expresar su potencial genético. En consecuencia, deberá ser de buen tamaño, tanto general como reproductivamente sana y de buena capacidad lechera. Esto no parece ser tan complicado, sin embargo tanto el tamaño como la producción de leche pueden tener significados diferentes. El tamaño de la receptora dependerá del tipo de animal (embrión) que se transferirá. De acuerdo con las tendencias actuales, particularmente en las razas para carne, se busca un gran tamaño de ternero con pesos al nacimiento de 40 a 50 kg y aún más. La edad de la receptora es un aspecto importante en el cual sin embargo, no hay coincidencias entre autores. Se debe recordar que el genotipo del embrión transferido es diferente al que la vaca hubiese tenido en un servicio de la propia raza. Si bien es cierto que la genética de la receptora no influye en la genética del embrión, el ambiente uterino (especialmente el espacio o tamaño) parece tener una interacción con el genotipo del feto mayor que la supuesta. El programa de alimentación de las receptoras es vital en el éxito final de la transferencia. (Alberio, 2004).

III. Materiales y Métodos

3.1 Ubicación del experimento

Este experimento se realizó en un rancho ganadero ubicado en el Municipio de Cuatro Ciénegas Coahuila, ubicado a 102° 03'59 longitud oeste y 26° 59'10 latitud norte, a una altura de 740 msnm. El rancho cuenta con ganado especializado en producción de carnes de las razas Bradford y Angus, contando en total con alrededor de 300 animales.

3.2 Animales experimentales

Los animales utilizados en el estudio fueron de la raza Bradford, siendo vaquillas primíparas con un peso aproximado de 360 kg, estas vaquillas estuvieron alojadas desde el mes de julio al mes de octubre en praderas artificiales y su dieta fue a base de alfalfa a libre pastoreo. Estos animales fueron sincronizados y preparados previamente para recibir un embrión criopreservado en nitrógeno líquido.

La sincronización fue a base de progestágenos y prostaglandina de la siguiente manera: primer día se colocó un dispositivo intravaginal (CIDR) y 2 ml/IM de benzoato de estradiol; a los 7 días se retiró el dispositivo y se aplicaron 2 ml/IM de prostaglandina (indusel) y 400 UI/IM de ECG (novormon 5000). Se detectó celo las 24 horas del día a partir de la inyección de indusel y se acentuó las 48 horas posteriores al retiro del dispositivo, como método auxiliar se utilizó el crayoneo en la base de la cola y se anotó el día y la hora del celo tomándolo como base para la transferencia embrionaria que fue 7 días posteriores a este.

El embrión congelado estuvo a una temperatura de -196°C con el crioprotector a base de Etilenglicol el cual fue descongelado en agua al baño maría a 35°C durante 15-20 seg. La transferencia se realizó 7 días posteriores al celo colocándose el embrión en el mismo lado en donde se detectó el cuerpo lúteo. Tomando la clasificación presentada por Marín (2012) valorando tamaño y consistencia del CL, vía palpación rectal de la siguiente manera:

- Cuerpo lúteo 1 (CL1): cuerpo lúteo blando, no mayor a 1 cm de diámetro.
- Cuerpo lúteo 2 (CL2): cuerpo lúteo blando, de 1 a 2 cm de diámetro.
- Cuerpo lúteo 3 (CL3): cuerpo lúteo de más de 2 cm de diámetro

Se transfirieron las receptoras con presencia de cuerpo lúteo de calidad 2 y 3.

El diagnostico de gestación se realizó por palpación rectal 40 días posteriores a la transferencia embrionaria.

3.3 Variables a analizar

Calidad del Cuerpo Lúteo

Tiempo de Embrionización

Tasa de Gestación

3.4 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza en el programa informático MYSTAT versión estudiantes, para hacer la comparación de la calidad del cuerpo lúteo y el tiempo utilizado en la embrionización.

IV. Resultados y Discusión

Con respecto a la calidad del cuerpo lúteo, se determinó palpando las receptoras antes de la transferencia y verificando que estuvieran en las categorías a evaluar y así poder llevar a cabo la embrionización. En la Tabla 1 se presentan los porcentajes de preñez de cada categoría evaluada. Obteniendo un 29% de preñez con CL2 y un 25% con CL3. El análisis realizado nos indica que los resultados encontrados no difieren estadísticamente $P > 0,05$.

Tabla 1. Efecto de la calidad del C.L. sobre la tasa de gestación de vaquillas Bradford que recibieron un embrión congelado.

Calidad C.L.	Cantidad Embrionizadas	Cantidad Preñadas	% de gestación
CL 2	17	5	29 a
CL 3	28	7	25 a

Literales iguales no difieren estadísticamente

Evaluando el uso de la transferencia de embriones en este experimento nos damos cuenta que se obtuvieron mejores resultados con un CL2 (cuerpo lúteo blando, de 1 a 2 cm de diámetro) obteniendo una tasa de concepción de 29 % y un 25% para CL3 (cuerpo lúteo de más de 2 cm de diámetro).

Según Duica *et al.* (2007), presentan la siguiente relación de tamaño del CL y niveles de progesterona encontrados al realizar seguimiento de la estructuras ováricas por medio de ultrasonografía a un grupo de 140 animales, los cuerpos lúteos de más de dos centímetros de diámetro producen niveles de progesterona circulantes de 2,44 ng/mL, y una tasa de concepción del 58% en hembras a las que se le transfirió un embrión el día siete postcelo; a las hembras que se les encontraron cuerpos lúteos de 1,5 centímetros de diámetro producen niveles de progesterona circulantes de 1,75 ng/mL, y una tasa de concepción del 41%; y, a las hembras a las que se les encontraron cuerpos lúteos menores de 1,5 centímetros de diámetro presentaron niveles de progesterona circulantes de 1,19 ng/mL, y una tasa de concepción del 31%. Mientras que al encontrar un cuerpo lúteo de 2,36 centímetros de diámetro se detectó una concentración plasmática de progesterona equivalente a 4,2 ng/mL y una tasa de preñez del 70%, en hembras receptoras de embriones a las que se les fue transferido el embrión el día siete postcelo.

En otro experimento hecho por Duran y Ortiz (2010), de acuerdo al tamaño del CL, obtuvieron las siguientes tasas de preñez: 52,4% de preñez de 1.579 TE realizadas a receptoras con un CL1 (> 2,0 cm²); 39,0% de 693 TE en receptoras con un CL2 (1,5 a 2,0 cm²); 15,9% de 63 TE en receptoras con CL3 (< 1,5 cm²).

Por otra parte, Oyuela (2009) presenta los siguientes resultados CL <10 mm un 28% de preñez, CL 10-15 mm 39% y CL >15 mm 39%.

Sin embargo otros autores dicen que no es posible establecer una relación entre la calidad del cuerpo lúteo y la preñez de una receptora (Palma, 2004; Cutini *et al.*, 2000).

En cuanto al Tiempo de Embrionización se clasifico de 0:00-2:59min y más de 3:00min, obteniendo porcentajes de preñez de 24 y 30, respectivamente. Estos resultados se presentan en la Tabla 2, no siendo estadísticamente diferentes ($P>0,05$).

Tabla 2. Tasa de preñez de acuerdo al tiempo de embrionización (minutos) en vaquillas Bradford que recibieron un embrión congelado.

Tiempo de Embrionización	Cantidad Embrionizadas	Cantidad Preñadas	% de gestación
0:00-2:59	25	6	24 a
Más de 3:00	20	6	30 a

Literales iguales no difieren estadísticamente

En estudios anteriores entre otros factores, se han analizado los efectos de la dificultad al momento de la transferencia de embriones PIV sobre la tasa de preñez. Las transferencias realizadas sin ningún tipo de dificultad (n=40) tuvieron tasas de preñez significativamente diferentes ($p<0,05$) frente a aquellas realizadas con algún tipo de dificultad (n=33), donde se incluyen movimientos bruscos de la receptora, receptoras problemáticas y evidencias de sangre en la pistola de TE. Esto resulta en 53% de preñez para las TE sin

dificultad frente a 21% de preñez en los casos en los que hubo alguna dificultad (Oyuela y Jiménez, 2010).

De la fuente (2004), dice que el factor humano varía las tasas de fertilidad del 20% al 67% según la habilidad de cada técnico.

Por otra parte, Oyuela y Jiménez (2010) mencionan que hay un 53% de preñez para las TE sin dificultad frente a 21% de preñez en los casos en los que hubo alguna dificultad.

Mientras que Cutini *et al.* (2000), dice que la velocidad con la que el operador realiza dicha maniobra depende principalmente del grado de dificultad que encuentra para atravesar el cérvix. En esas circunstancias, la experiencia resulta de vital importancia; observándose que cuando el pasaje a través del cérvix se realiza sin dificultad, los porcentajes de preñez son mayores. Del mismo modo, operadores con experiencia pueden lograr buenos porcentajes de preñez (50%) aun cuando deben transferir los embriones a receptoras que presentan un cuello uterino tortuoso, difícil de enhebrar. El grado de dificultad al atravesar el cérvix con el instrumental y la dificultad para depositar el embrión en el sitio deseado del útero, afecta significativamente la tasa de abortos

V. Conclusiones

A pesar que en la literatura internacional la calidad del cuerpo lúteo y el tiempo utilizado en la embrionización se mencionan como factores importantes que afectan la tasa de gestación de la receptora, en este trabajo no encontramos diferencias estadísticas que avalen este planteamiento.

VI. Referencias

1. Alberio R.H. 2004. Manejo de Donantes y Receptoras. Disponible en línea: www.reprobiotec.com./libro_rojo/capitulo_02.pdf (Fecha de verificación: 25/09/2014).Pág.9-12.
2. Anchondo A.G., Barceló M.F., Flores A.M., Domínguez D.D., Ruiz O.B., Villalobos G.V. 2009. Evaluation of Factors in the Recipient and the Embryo on Pregnancy Rates during Embryo Transfer in Beef Cattle. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Pág. 64-68.
3. Ariza L.E., Camacho W., Serrano N.C.A. 2006. Retrospective analysis of pregnancy rate after embryo transfer on F1 cows in the municipio of Puerto Araujo, Santander, Colombia. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET, Vol. VII, nº 04 Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040406.html>. (Fecha de verificación: 30/09/2014). Pág. 1-7.
4. Arriaga V.J. 2010. Transferencia de Embriones en Bovinos. Revisión. Tesis profesional. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.Pág.1-55.

5. Atencio G.V.J., Dorado M., Navarro E., Pérez E., Herrera B., Movilla J., Espinosa A.J.A. 2014. Evaluation of Ethylene Glycol as a Cryoprotectant in the Sperm Cryopreservation of Trans-Andean Shovelnose Catfish (*Sorubim cuspicaudus*, Pimelodidae). *Acta biológica Colombiana*. Pág. 271-280.

6. Avila A. 2004. Transferencia de Embriones en Ganado Bovino. La Posta Paso del Toro, Veracruz. INIFAP. Pág. 1-3.

7. Belascoain M.G., Díaz É.T., Hüter S. 2010. Técnicas para la Criopreservación de Embriones Bovinos. Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela para Graduados. Instituto de Reproducción Animal Córdoba. (IRAC). Pág. 1-19.

8. Bó G.A., Moreno D., Cutaia L-E., Caccia M. Tríbulo R.J., Tríbulo H.E. 2004. Fixed-Time Embryo Transfer Programs: Treatments and Factors Affecting Pregnancy Rates. Laboratorio Syntex S.A. Instituto de Reproducción Animal Córdoba. Pág. 1-17.

9. Bolívar P. A., Maldonado E. J. G. 2008. Cost analysis of protocols for transfer of bovine embryos used in Colombia. *Revista colombiana de ciencias pecuarias* .Pág. 351-364.

10. Bolívar P. A., Maldonado E. J. G. 2010. Racionalidad de los esquemas de superovulación y sincronización en la transferencia de embriones en bovinos: terapéutica basada en la evidencia o ausencia de ética. Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, y Sede de Investigación Universitaria (SIU, Lab-233), Universidad de Antioquia, Colombia. Pág. 1-12.

11. Capitaine F. A. 2005. Factores que afectan la Tasa de Preñez en rodeos lecheros en Argentina. Magíster en Producción Animal Pontificia Universidad Católica de Chile. Pág. 1-16.

12. Colazo M.G., Mapletoft R.J. 2007. Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. Ciencia veterinaria vol. 9, La Pampa: República Argentina .Pág. 20-37.

13. Cutini A., Teruel M., Cabodevila J. 2000. Factores que determinan el resultado de la Transferencia no Quirúrgica en Embriones Bovinos. Revista Taurus. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Pág. 1-24.

14. De la Fuente M.J.F. 2004. Transferencia de Embriones en Ganado Bovino. Disponible en:
http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/lib

ro_reproduccionbovina/cap24.PDF. (Fecha de verificación: 05/10/2014). Pág.375-388.

15. De Luca L. 2002. Método "One Step" de Crioconservación Embrionaria. Laboratorios Burnet S.A. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embrionario/07-onestip.pdf. (Fecha de verificación: 04/10/2014). Pág. 1.
16. Díez M.C. 2003. Congelación de Embriones Bovinos Producidos In Vitro. Departamento de Producción Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, prov. de Córdoba, Argentina. Pág.1-8.
17. Duica A.A. 2010. Efecto del diámetro del folículo ovulatorio, tamaño del cuerpo lúteo y perfiles de progesterona sobre la tasa de preñez en la hembra receptora de embriones bovinos. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia Maestría en Salud Animal Bogotá D.C. Pág. 1-190.
18. Duica A.A., Tovia L.N., Grajales L.H. 2007. Factors that affect the reproductive efficiency of the recipient within a bovine embryo transfer program. Revista de Medicina Veterinaria. Facultad de Medicina

Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Pág. 107-124.

19. Duran C.J., Ortiz T.J. 2010. Efecto del tamaño del cuerpo lúteo en la tasa de preñez en receptoras de embriones bovinos. Facultad de Ciencias Veterinarias, UAGRM. Pag.1-10.

20. Filipiak Y., Larocca C. 2012. Biotecnología en Reproducción Bovina. universidad de la republica facultad de veterinaria área de biotecnología y de la reproducción animal Montevideo, Uruguay. Pág. 1-42.

21. Fricke M. P. 2003. La ecuación de la reproducción en los rodeos lecheros. Revista Taurus. University of Wisconsin-Madison, USA. Pág. 1-5.

22. Gil M.A.D, R. 2011. Effect of cryopreservation method and blatocoelectomy on in vitro bovine embryo development. Tesis profesional: Universidad veracruzana facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Pág.1-41.

23. Giraldo G.J.J., Gómez O.J., Vásquez A.N. 2012b. Effect of Dimethylformamide on the post-vitrification feasibility of in vitro

produced bovine embryos. Revista Lasallista de Investigación. Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Pág.13-20.

24. Giraldo G.J.J., Ordóñez R.S., Álvarez A.A. 2012a. Vitrification as an alternative to conserve in vitro produced embryos. Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Pág. 38-51.

25. Gómez O.J., Restrepo B.G., Vásquez A.N. 2010. Ethylene glycol's effect on the post-devitrification morphology of immature bovine oocytes. Revista Lasallista de Investigación - Vol. 7 No. 1. Pág. 42-48.

26. Irouléguy J.M. 2009. Transferencia de Embriones Frescos a Tiempo Fijo: Algunas Variables que afectan la Tasa de Preñez. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA). Pág. 1-11.

27. Mapletoft R.J., Hasler J.F. 2005. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. Review science technology Off. int. Epiz. Pág. 393-403.

28. Marín R.J.R. 2012. Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de transferencia de embriones bovinos. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Pág. 1-112.

29. Martín I., Monge A. 2012. Congelación de Embriones Equinos: Factores a tener en cuenta y desarrollo de la técnica. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. Guadalix de La Sierra. Madrid Pág. 114-121.
30. Martínez A.G. 2006. Optimización de métodos de criopreservación de embriones bovinos y ovinos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Pág. 1-165.
31. Medrano R. J., Evangelista V.S., Sandoval M.R., Ruiz G.L., Delgado C.A., Santiani A.A. 2014. Application of the non-surgical bovine embryo transfer technique in a dairy farm in the Lima milkshed. Revista de Investigacion Veterinaria de Perú. Pág. 95-102.
32. Mucci N., Aller J., Cabodevila J., Kaiser G., Hozbor F., Alberio R.H., Taurus B. A. 2006. Criopreservación de Embriones Bovinos. Lab. de Producción in vitro de Embriones, Depto. de Producción Animal, E.E.A. INTA Balcarce. Área de obstetricia, Fac. Cs. Vet., UNICEN., Tandil, Argentina. Pág. 1-11.

33. Ochoa O.J.T. 2011. Criopreservación de Embriones Bovinos. Tesis Profesional. Facultad De Ciencias Agropecuarias. Escuela De Medicina Veterinaria Y Zootecnia. Pág. 1-65.
34. Orellana B.J.C., Peralta P.E.M. 2007. Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and Sexing Technologies. Tesis profesional. Ciencia y Producción Agropecuaria. Zamorano Honduras. Pág. 1-42.
35. Ortega S.J.L., Favela R.J.E., Hernández S.J.R., Pawoli G.C.B. 2011. Effect of the application of an implant of progesterone in relay cows Holstein-Friesian in the Comarca Lagunera, Mexico. Revista Chapingo Serie Zonas Áridas. Pág. 73-78
36. Oyuela L.A. 2009. Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones producidos in-vitro, en razas cebuinas. Tesis Profesional. Universidad Nacional. Facultad De Medicina Veterinaria y Zootecnia. Bogotá D.C. Pág.1-91.
37. Oyuela L.A., Jiménez C. 2010. Factors that affect pregnancy rates in embryo transfer programs. Journal Systems. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Pág. 1-9.

38. Palma G.A. 2004. Transferencia de los Embriones. Disponible en: http://www.reprobiotec.com/libro_rojo/capitulo_08.pdf. (fecha de verificación: 07/10/2014). Pág. 85-98.
39. Palma G.A.; Brem G. 2004. Biotecnología de la Reproducción. Disponible en: http://www.reprobiotec.com/libro_azul/cap_01.pdf. (fecha de verificación: 10/10/2014). Pág. 1-19.
40. Ramón C.J.C. 2013. “Evaluación de dos Agentes Crioprotectores no Permeables y un Diluyente Comercial (Triladyl) en la Congelación de Semen Bovino”. Tesis Profesional. Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Centro de Postgrado. Pág. 4-65.
41. Rodríguez M.J., Giraldo E.C., Castañeda P.S., Ruiz C.T., Olivera A.M. 2007. Multifactorial Analysis of Pregnancy Rates in Embryos Transfer Programs in Colombia. Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias. Revista. MVZ. Córdoba Pág. 978-984.
42. Solórzano H.C.W., Hernán M.J., Galina H.C., Villa G.A., Vera A.H.R., Romo G.S. 2008. Reuse of a progesterone releasing device (CIDR-B) for estrus synchronization within an embryo transfer program in bovines. Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Pág. 119-135.

43. Vázquez E.M., Cueva M.S., Cordero R.A., Gonzales C.M.L., Huanca L.W. 2011. Evaluation of two embryo cryopreservation methods in llama on the in vivo e in vitro embryonic survival rates. Revista de Investigación Veterinaria de Perú. Pág. 190-198.