

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN EL GANADO CRIOLLO LECHERO TROPICAL

Comparison of two embryo transfer methods in the tropical milking criollo cattle

Fernando Naranjo-Chacón¹, Carlos Miguel Becerril-Pérez², Rodolfo Canseco-Sedano³, Oscar Enrique Zárate-Guevara³, Alejandra Soto-Estrada¹, Froylan Rosales Martínez¹, Adalberto Rosendo-Ponce^{1*}

¹ Campus Veracruz, Colegio de Postgraduados, Carretera Federal Xalapa-Veracruz, km 88.5, CP. 94251, Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, México.

² Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, Carretera Federal México-Texcoco, km 36.5, CP. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México

³ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, Miguel Ángel de Quevedo s/n Esq. Yáñez, CP. 91710, Veracruz, Veracruz, México

*Autor de correspondencia: arosendo@colpos.mx

Nota científica recibido: 18 de Julio de 2014, **aceptado:** 16 de febrero de 2015

RESUMEN. En el ganado Criollo Lechero Tropical (CLT), se desconoce el mejor método para la criopreservación de sus embriones para transferencia. El objetivo del estudio fue comparar los métodos por curva lenta y vitrificación en receptoras CLT puras y mestizas; se realizó en Veracruz (CP) y Guerrero (OG). Los tratamientos se asignaron de forma aleatoria: seis embriones para CLT y cuatro para mestizas por curva lenta, así como cinco en CLT y cinco en mestizas por vitrificación para CP. En OG, se destinaron cuatro para curva lenta en CLT y cinco en mestizas; para vitrificación, seis en CLT y cinco en mestizas. El análisis de datos se realizó con la prueba de Fisher. No se encontró efecto del método de criopreservación en el porcentaje de gestación ($p > 0.05$) y se obtuvieron 10 y 20 % en CP ($p \leq 0.50$), 11 y 27 % en OG ($p \leq 0.375$) para curva lenta y vitrificación, respectivamente.

Palabras clave: América, criopreservación, curva lenta, vitrificación

ABSTRACT. It is unknown which is the best method for the cryopreservation of Tropical Milking Criollo cattle (TMC) embryos for transfer. The objective of this study was to compare slow curve and vitrification methods in pure and Criollo TMC; this was done in the states of Veracruz (CP) and Guerrero (OG). The treatments were randomly assigned: in CP, six embryos in TMC and four in half-caste by slow curve, as well as five in TMC and five in half-caste by vitrification. In OG, four were destined for slow curve in TMC and five in half-caste; for vitrification, six in TMC and five in half-caste. The data analysis was done using the Fisher's test. No effect was found in the cryopreservation method in the gestation percentage ($p > 0.05$); 10 and 20% were obtained in CP ($p \leq 0.50$), and 11 and 27% in OG ($p \leq 0.375$) for slow curve and vitrification, respectively.

Key words: America, cryopreservation, slow curve, vitrification

INTRODUCCIÓN

El primer éxito en la transferencia de embriones (TE) de mamíferos fue en 1890, aproximadamente, 60 años antes de que se informara sobre un avance significativo en la tecnología básica de la TE en el ganado bovino (1890). A partir de 1970, la tecnología avanzó lo suficiente como para realizar programas de TE. La tec-

nología está comercialmente establecida en los países desarrollados, con programas estructurados entre la industria y las empresas ganaderas para realizar la mejora genética de las razas de ganado, además de disminuir problemas reproductivos y sanitarios (Hasler 2014).

Los métodos más importantes de criopreservación por congelación de embriones para transferencia son curva lenta y la vitrificación

(Martínez 2008). El método de curva lenta utiliza equipos programables, que congelan los embriones a temperatura y tiempo determinados. Mientras que la vitrificación los congela de forma rápida en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Saragusty y Arav 2011). Por curva lenta se ha obtenido 41 % de gestación en receptoras *Bos indicus* x *Bos taurus* en la región tropical de Brasil (Bényei et al. 2006) y 45 % con embriones bovinos producidos *in vitro* (Youngs 2011). La vitrificación se considera superior a la curva lenta, ya que no genera cristales de hielo intracelular y produce niveles de gestación sólo 10 % inferiores a los de embriones frescos (Hasler 2014). Con embriones vitrificados, se ha obtenido 65 % de gestación en receptoras Holstein, en España (Hidalgo et al. 2004), y 45 % en receptoras Polled Hereford, en Argentina (Martínez y Valcárcel 2008). La criopreservación es un procedimiento fiable en embriones producidos *in vivo*, aunque requiere de mejoras para embriones *in vitro* (Hasler 2014). La TE y la inseminación artificial pueden contribuir a la difusión y preservación de razas en peligro de extinción, como la Criollo Lechero Tropical (CLT) (FAO 1981), a través de la formación *ex situ* de bancos de germoplasma de embriones y pajillas de semen. Asimismo, posibilitan obtener animales puros en periodos más breves que a través de encaste (Hasler 2014).

El CLT es una raza productora de leche adaptada a los climas cálidos (Rosendo-Ponce y Becerril-Pérez 2015), pero requiere de biotecnologías reproductivas avanzadas para su conservación, difusión entre criadores de la raza, ganaderos y comercialización nacional e internacional. La criopreservación y la TE pueden contribuir a producir animales genéticamente superiores para aumentar la producción de leche en México y otros países (SIAP 2013). Por lo anterior, el objetivo del estudio fue comparar los métodos de criopreservación por curva lenta y vitrificación, en embriones CLT transferidos a hembras puras y mestizas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Colegio de Post-

graduados Campus Veracruz (CP) y el rancho Los Encinos (OG). El CP está ubicado en el municipio de Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, en las coordenadas $19^{\circ} 11' 38''$ N y $96^{\circ} 20' 13''$ O, con altitud de 23 msnm. Tiene una superficie ganadera de 40 ha, con relieve irregular y diferencia de altitud de 14 a 19 msnm. El clima es cálido subhúmedo, AW_1 (w) (i') g, con temperatura media anual de $26.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y precipitación fluvial anual de 1230 mm, distribuida de mayo a octubre. El rancho Los Encinos está ubicado en el municipio de Olinalá, Guerrero, en la Región de la Montaña en las coordenadas $17^{\circ} 59' 51''$ N y $98^{\circ} 52' 08''$ O, con altitud de 1284 msnm. La superficie ganadera es de 100 ha, con pendientes pronunciadas y relieve irregular. Predomina el clima semicálido subhúmedo Aw_0 (w), con temperatura media anual de $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ y precipitación media anual de 800 mm, con lluvias predominantes de julio a septiembre (García 1988).

En el CP, se seleccionaron 20 hembras reproductoras que se encontraban ciclando, permitieron el paso del aplicador y no presentaron quistes ováricos o fibrosis en el tracto uterino. Se seleccionaron 11 CLT y nueve mestizas (Suizo Pardo x Cebú), de 64.8 ± 5.1 meses de edad y 439.2 ± 12.1 kg de peso. Por otro lado, en OG se seleccionaron 20 hembras receptoras multíparas, lactancia de más de 90 d, con iguales condiciones uterinas que en el CP. Se seleccionaron 10 CLT y 10 mestizas (CLT X Europeo) de 92.1 ± 5.2 meses de edad y peso de 382.8 ± 7.1 kg. En CP y OG, la condición corporal de las hembras fue 2.80 ± 0.01 y 2.78 ± 0.10 kg, en escala 1 (emaciado) a 5 (obeso) (Houghton et al. 1990). El número de unidades experimentales (hembras receptoras) fue reducido en comparación con otros estudios realizados en razas lecheras de clima templado, ya que la población de hembras CLT es pequeña y está en peligro de extinción (FAO 1981). Cada hembra receptora fue desparasitada con ivermectina al 1 % (Virbamec classic) y con amitraz a 12.5 % (Bovitraz). Se detectaron celos dos veces al día, de 8 a 9 h y de 17 a 18 h, durante un mes, mediante la observación directa de montas, montas fallidas, intentos de monta, la presencia de flujo vaginal y ocurrencia de sangrado tres días después

de la presencia del celo.

Alimentación de las receptoras

En el CP, las receptoras se pastorearon en potreros de grama nativa (*Paspalum spp*), estrella africana (*Cynodon plectostachyus*) y pará (*Brachiaria mutica*), bajo rotación. Previo a la TE, se les proporcionó durante 50 d $1 \text{ kg d}^{-1} \text{ animal}^{-1}$ de suplemento comercial con 18 % de proteína cruda y agua a libre acceso. Las receptoras se separaron al inicio del experimento y dos días antes de la TE, en una báscula digital móvil True Test. Las receptoras en OG, pastorearon en potreros de grama nativa (*Paspalum spp*) y leguminosas locales, como el tlahuítol (*Lysiloma divaricatum*) y guaje blanco (*Leucaena leucocephala*). A cada receptora se le suministró un concentrado comercial con 18 % de proteína cruda, pollinaza y maíz molido, a razón de 1.5, 1.5 y 0.5 kg durante 60 d. Las receptoras se pesaron dos días antes de la TE. Cada receptora se inyectó de forma intramuscular con 8 ml de selenio y vitamina E (Mu-Se[®]) (Essex Animal Health Friesoythe). Además, de 10 ml de Butafosfan y protector hepático (Catosal ^{M.R.} con vitamina B 12) (Bayer HealthCare) en los días 15 y 30 previos a la sincronización de celo.

Selección de embriones para transferencia

Todos los embriones provenían de óvulos de hembras CLT puras, inseminadas con semen de toros CLT de registro. Se utilizaron 19 embriones por curva lenta y 21 por vitrificación de calidad uno, asignándose aleatoriamente 10 a cada método de criopreservación al CP y los restantes a OG. Cada embrión criopreservado por curva lenta se colocó de forma individual en una pajilla de 0.25 ml y se identificó con datos de la donadora. Entre uno y cuatro embriones criopreservados por vitrificación se colocaron en cryotops y se identificaron por donadora, cantidad y calidad.

Protocolo de sincronización del celo

Las receptoras sincronizaron con estrógenos y progestágenos. En el día cero, se les colocó un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (P₄)

(1.9 mg) (CIDR 1900 cattle insert, DEC Manufacturing N2 Pfizer) y se les inyectó vía intramuscular 2 mg de benzoato de estradiol (Be₂) (Estilbo vitaminado, SYVA); en el día cinco, se le inyectó 400 UI de gonadotropina coriónica equina (Folligon 1000 U.I. Intervet) y 5 ml de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) (Lutalyse, Pharmacia Upjohn, Pfizer USA); mientras que en el día ocho, se les retiró el dispositivo intravaginal e inyectó 1 mg de cipionato de estradiol (Ce₂) (ECP Pfizer). Al 10 d se observaron signos relacionados a la presencia de celo, por lo que se previó la ocurrencia de ovulación en las siguientes 24 h; mientras que al día 17 se diagnosticó, vía palpación rectal, la presencia de cuerpos lúteos en los ovarios y se depositó el embrión en el cuerno uterino.

Proceso de transferencia de embriones

Las pajillas con embriones congelados por curva lenta se extrajeron del termo criogénico y se sumergieron en agua a 37 °C durante 30 s, se retiró el tapón y se colocaron en el aplicador de transferencia. Los embriones vitrificados se extrajeron del cryotop y se sumergieron en una gota de 500 μl de una solución de calentamiento (SC) a 37 °C por 1 min, para luego colocar dos gotas de una solución de dilución (SD) a temperatura ambiente por 2 min, para luego exponer en tres gotas de 20 μl en una solución de lavado (SL), durante 3 min (Kuwayama, 2007), para finalmente, cargar en una pajilla de 0.25 ml con solución PBS (Bioniche, Pharma, Canadá) y colocar en el aplicador de transferencia. La SC estuvo compuesta de PBS, sustituto de suero sintético (SSS) a 20 % y sucrose 1 M (Sigma-Aldrich); la SD de PBS, SSS a 20 % y sucrose 0.5 M y la SL de PBS y SSS a 20 %.

Al momento de la TE, se determinó la presencia de un cuerpo lúteo mayor de 1.5 cm de diámetro, se realizó asepsia del perineo y se inyectó vía epidural lidocaína (Pisicaina 2 %, PISA); un aplicador metálico de transferencia cubierto con una funda estéril, se introdujo en la vagina, hasta el cuerpo lúteo palpado (Hafez y Hafez 2002). El diagnóstico de gestación se realizó mediante palpación recto-vaginal 50 d después de la transferencia. Todo el proceso de TE se realizó en condiciones de campo

de clima cálido tropical, lo que pudo influir en los resultados.

Análisis estadístico

En CP y OG, los tratamientos se asignaron de forma aleatoria a las receptoras de ambos genotipos. En CP, por curva lenta, seis embriones para CLT y cuatro para mestizas, y cinco vitrificados en receptoras CLT y cinco en mestizas. En OG, la asignación de tratamientos a receptoras de ambos genotipos fue de cuatro embriones por curva lenta en receptoras CLT y cinco en mestizas; para embriones vitrificados, seis en receptoras CLT y cinco en mestizas. Las variables de respuesta fueron estado de gestación (1 gestante, 0 no gestante) y el tamaño del cuerpo lúteo (1 pequeño, 2 mediano y 3 grande). Los datos se analizaron utilizando la prueba exacta de Fisher, con el PROC FREQ del SAS (SAS Institute 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se encontraron efectos significativos de método de criopreservación y de genotipo de las receptoras ($p > 0.05$). Los niveles de gestación por método de criopreservación fueron 10 y 20 % para curva lenta y vitrificación en CP ($p \leq 0.50$), y 11 y 27 % en OG ($p \leq 0.375$). Los porcentajes de gestación por genotipo fueron 27 y 0 en CP ($p \leq 0.145$) y 30 y 10 % en OG ($p \leq 0.294$) para receptoras CLT puras y mestizas (Figura 1). Se observó una tendencia consistente de mayor porcentaje de gestación para la vitrificación en receptoras CLT puras. Se obtuvo aproximadamente una cuarta parte de lo reportado en la literatura, por curva lenta y aproximadamente la mitad de lo reportado en la literatura, por vitrificación. Del total de hembras CLT 28.6 % y sólo el 5.6 % de las mestizas quedaron gestantes. Los niveles de gestación fueron menores a 48.6 %, obtenido con embriones criopreservados por curva lenta y transferidos a receptoras mestizas *Bos Taurus x Bos indicus* en Venezuela (González *et al.* 1997). Sin embargo, fueron más cercanos a 33.2 y 13.9 % en condiciones templadas y en época cálida en vacas re-

ceptoras Holstein lactantes del altiplano central de Aguascalientes, México (Lozano *et al.* 2010). El estrés calórico puede afectar el medio materno interno para establecer la gestación y reducir el desarrollo y viabilidad inicial de los embriones producidos tanto *in vivo* como *in vitro* (Jousan y Hansen 2004). En Brasil, con embriones Holstein congelados por curva lenta transferidos a receptoras *Bos indicus x Bos taurus*, se obtuvo 41 % de gestación (Bényei *et al.* 2006). Mientras que en Florida, con embriones Romosinuano y Brahman transferidos a receptoras Angus x Brahman, se obtuvo entre 49 y 54 % de gestación (Hernández *et al.* 2004), mientras que Chase *et al.* (2009) encontraron que la edad de las receptoras y la calidad del embrión afectaron el porcentaje de gestación.

Para los embriones CLT obtenidos por curva lenta en el presente estudio, los porcentajes de gestación fueron menores a los indicados por otros autores (González *et al.* 1997, Bényei *et al.* 2006, Chase *et al.* 2009, Youngs 2011), aunque similares a lo indicado por Lozano *et al.* (2010). En el CP, la transferencia se realizó durante junio y julio, con temperaturas medias de 34.4 °C, lo que pudo afectar la viabilidad del embrión y disminuir el porcentaje de gestación. Por su parte, en OG la transferencia se realizó en octubre, con temperaturas medias de 22.5 °C. Al respecto, Oyuela y Jiménez (2010) mencionan que factores como el manejo de las receptoras, traumatismos del animal y una deficiente alimentación y suplementación mineral pueden reducir el porcentaje de gestación de la TE.

La criopreservación por vitrificación es mejor que por curva lenta, ya que se utilizan soluciones acuosas concentradas de agentes crioprotectores que impiden la formación de cristales de hielo en el embrión durante su enfriamiento. 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 receptoras Holstein, con ello se ha logrado 55 % de gestación (Chebel *et al.* 2008); mientras que en receptoras de 15 a 18 meses de edad, bajo temperaturas medias de 12.2 y 17.3 °C, se obtuvo 64.9 % de gestación



Figura 1. Porcentaje de gestación con embriones Criollo Lechero Tropical (CLT) obtenidos por vitricificación (□) y curva lenta (◻) en Tepetates, Veracruz (a) y Olinalá, Guerrero (b).

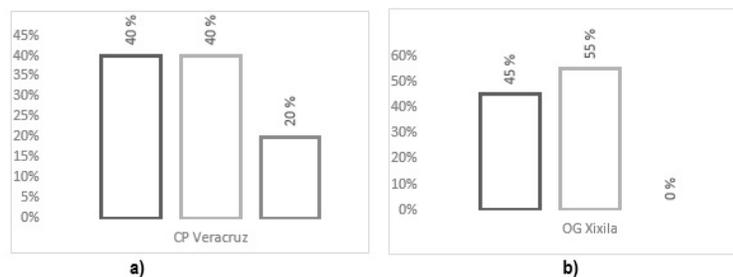


Figura 2. Porcentaje de cuerpos lúteos calidad tres (□), dos (◻) y uno (◻) en Tepetates, Veracruz (a) y Olinalá, Guerrero (b).

(Hidalgo *et al.* 2004); por otro lado, en receptoras lactantes, el porcentaje de gestación ha sido de 34.5 % (Rodríguez *et al.* 2010). Al respecto, Dochi *et al.* (2008) indican que las vaquillas son las receptoras más adecuadas, por tener menor incidencia de estrés nutricional, enfermedades uterinas y problemas post-parto; por lo anterior, un mayor número de vaquillas responden al tratamiento de sincronización con progesterona y quedan gestantes con la TE (Stroud y Hasler 2006). Aunque las hembras CLT podrían ser menos sensibles a condiciones adversas de temperatura y humedad altas, debido a su adaptación a climas cálidos tropicales (Santellano *et al.* 2011), los menores porcentajes de gestación pueden atribuirse a factores endocrinos, celulares y moleculares (Fuentes y de la Fuente 2007). La calidad y el estado de desarrollo del embrión influyen en el éxito de la TE. Se obtiene menor porcentaje de gestación con mórulas que al transferir embriones en estado más avanzado (Looney *et al.* 2006). Al respecto, Hasler (2001)

encontró porcentajes de gestación estadísticamente diferentes para embriones calidad uno (73.2 %), dos (68.3 %) y tres (56.3 %), pero no encontró diferencias entre diversos estados de desarrollo. Mientras que Oyuela y Jiménez (2010) indican que el porcentaje de gestación es mayor cuando se transfieren embriones de la mejor calidad y en estado de desarrollo de blastocisto.

En CP, 40 % de las receptoras presentó cuerpo lúteo calidad tres y 40 %, calidad dos, con diámetros superiores a 1.5 cm, tamaño que se considera óptimo para realizar la TE; por otro lado, 20 % presentó cuerpos lúteos calidad uno, cuyo diámetro fue inferior a 1.5 cm, lo cual es no apropiado para hacer la transferencia; sin embargo, a todas las receptoras en CP se les transfirió un embrión. Todas las receptoras en OG presentaron cuerpo lúteo, 45 % calidad tres y 55 % calidad dos, con diámetro superior a 1.5 cm (Figura 2). Un cuerpo lúteo grande mantiene la producción de progesterona, lo que propicia mayor por-

centaje de gestación después de la TE (Baruselli *et al.* 2010); sin embargo, se ha encontrado que no existe correlación entre el tamaño del cuerpo lúteo, la concentración de progesterona y el porcentaje de gestación de las receptoras (Tovío *et al.* 2008, Herzog *et al.* 2010, Butler *et al.* 2011, Hasler 2014). Al respecto, Vieira *et al.* (2014) mencionan que la evaluación de la calidad del cuerpo lúteo en receptoras puede mejorar la precisión en la selección de receptoras y aumentar el porcentaje de gestación.

Se concluye que los porcentajes de gestación fueron similares entre la criopreservación por curva lenta y vitrificación, entre receptoras CLT puras

y mestizas, y fueron menores a los estimados en otros estudios con otras razas y en condiciones ambientales favorables. No se tiene evidencia de qué factores influyeron en los bajos porcentajes de gestación, aunque la tendencia fue un mayor porcentaje de gestación para vitrificación y receptoras CLT puras. Se sugiere realizar estudios que consideren la endocrinología y fisiología reproductiva de las receptoras y el seguimiento del proceso de maduración del embrión.

LITERATURA CITADA

- Baruselli PS, Ferreira RM, Sá-Filho MF, Nasser FT, Rodrigues CA, Bó GA (2010) Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *Reproduction Fertility and Development* 22: 67-74.
- Bényei B, Komlósi I, Pécsi A, Pollott G, Heraldo CC, de Ocampos AC, *et al.* (2006) The effect of internal and external factors on bovine embryo transfer results in a tropical environment. *Animal Reproduction Science* 93: 268-279.
- Butler S, Phillips N, Boe-Hansen G, Bó G, Burns B, Dawson K, *et al.* (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. *Animal Reproduction Science* 129: 118-126.
- Chase CC, Vargas CA, Hammond AC, Olson TA, Griffin JL, Murphy CN, *et al.* (2009) Embryo transfer in Angus and Brahman recipient cows: effect of methods of estrus synchronization on induced estrus and pregnancy. *Revista Científica* 19: 630-638.
- Chebel R, Demetrio D, Metzger J (2008) Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology* 69: 98-106.
- Dochi O, Takahashi K, Hirai T, Hayakawa H, Tanisawa M, Yamamoto Y, *et al.* (2008) The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. *Theriogenology* 69: 124-128.
- FAO (1981) Recursos genéticos animales en América Latina. Estudio FAO: Producción y sanidad animal 22. <http://www.fao.org/docrep/009/ah223s/AH223S00.htm#TOC>. Fecha de consulta 5 de febrero 2014).
- Fuentes S, de la Fuente M (2007) Tasas de gestación de novillas receptoras, sincronizadas con gonadotrofina coriónica equina u hormona folículo estimulante. *Acta Scientiae Veterinariae* 35: s767-s772.
- García E (1988) Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 191p.
- González R, Velarde J, Zambrano S, Esté P (1997) Producción y trasplante de embriones congelados de bovinos Criollo Limonero. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 5(supl.1): 370-372.
- Hafez E, Hafez B (2002) Reproducción e Inseminación artificial en Animales. 7 ed, McGraw-Hill Interamericana. México. 320p.

- Hasler JF (2001) Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56: 1401-1415.
- Hasler JF (2014) Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology* 81: 152-169.
- Hernández J, Chase C, Hansen P (2004) Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus Breeds. *Journal Dairy Science* 87: 53-58.
- Herzog K, Brockhan-Lüdemann M, Kaske M, Beindorff N, Pual V, Niemann H, et al. (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, Gómez E, Prieto L, Duque P, Goyache F, Fernández L, et al. (2004) Pregnancy rate and metabolic profiles in cattle treated with propylene glycol prior to embryo transfer. *Theriogenology* 62: 664-676.
- Houghton P, Lemenager R, Moss G, Hendrix K (1990) Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. *Journal Animal Science* 68: 1428-1437.
- Jousan DF, Hansen PJ (2004) Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biology of Reproduction* 71: 1665-1670.
- Kuwayama M (2007) Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Criotop method. *Theriogenology* 67: 73-80.
- Looney CR, Nelson JS, Schneider HJ, Forrest DW (2006) Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology* 65: 201-209.
- Lozano DRR, Asprón MAP, Vásquez CGP, González EP, Aréchiga CFF (2010) Efecto del estrés calórico sobre la producción embrionaria en vacas superovuladas y la tasa de gestación en receptoras. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 1: 189-203.
- Martínez D (2008) Situación actual de la transferencia de embrionaria. Revisión y actualización. *Frisona Española* 164: 72-78.
- Martínez A, Valcárcel A (2008) Vitrificación de embriones bovinos obtenidos *in vitro*. *Reproduction* 23: 23-33.
- Oyuela LA, Jiménez C (2010) Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones. *Medicine Veterinary and Zootechnics* 57: 191-200.
- Rodríguez C, Teixeira A, Ferreira R, Ayres H, Mancilha R, Souza A, Baruselli P (2010) Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. *Animal Reproduction Science* 118: 110-117.
- Rosendo-Ponce A, Becerril-Pérez CM (2015) Avance en el conocimiento del bovino Criollo Lechero Tropical de México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 2: 233-243.
- Saragusty J, Arav A (2011) Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 141: 1-19.
- SAS Institute (2010) SAS 9.3 for Windows. SAS Inst Inc Cary NC, USA.
- Santellano E, Becerril CM, Mei Y, Gianola D, Torres G, Ramírez R, et al. (2011) Caracterización de la lactancia y evaluación genética del ganado Criollo Lechero Tropical utilizando un modelo de regresión aleatoria. *Agrociencia* 45: 165-175.

- SIAP (2013) Boletín de leche enero-marzo de 2013. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 64p.
- Stroud B, Hasler JF (2006) Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology* 65: 65-76.
- Tovío L, Duica A, Grajales L (2008) Desarrollo embrionario y estrategias antiluteolíticas hormonales en programas de trasplante de embriones bovinos. *Medicine Veterinary and Zootechnics* 13: 1240-1251.
- Vieira LM, Rodrigues CA, Mendanha MF, Sá-Filho MF, Sales JN, Souza AH, *et al.* (2014) Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. *Theriogenology* 82: 204-212.
- Youngs C (2011) Cryopreservation of preimplantation embryos of cattle, sheep, and goats. *Journal Visualized Experiments* 54: 2764.