

FACTORES QUE AFECTAN LA TASA DE PREÑEZ EN PROGRAMAS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

L. A. Oyuela¹, C. Jiménez²

¹ Embriogen S.A.

² Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Artículo recibido: 9 de marzo de 2010; aprobado: 24 de mayo de 2010

RESUMEN

Desde mediados de los años setenta, la tecnología de transferencia de embriones (TE) se usó comercialmente para multiplicar rápidamente animales de genética valiosa. Posteriormente, con la congelación de embriones, se crea la posibilidad de movilizar animales entre países con barreras sanitarias. En la última década, con el uso comercial de embriones producidos *in vitro* (PIV) se dinamizó la producción de los mismos; en la práctica, son múltiples los factores que pueden influir en los resultados de los programas de TE, estos tienen orígenes muy diversos: factores del embrión (estado de desarrollo, calidad, componente genético, etc.), factores de la receptora (condición corporal, cuerpo lúteo) y factores externos (época del año, factores de manejo de los animales). Este documento abordará los temas asociados a los factores que podrían afectar las tasas de preñez en programas de TE.

Palabras clave: transferencia de embriones, receptoras, bovinos, embriones producidos *in vitro*.

FACTORS THAT AFFECT PREGNANCY RATES IN EMBRYO TRANSFER PROGRAMS

ABSTRACT

Since mid 70's, the Embryo Transfer (ET) technology was commercially used to quickly reproduce animals of valuable genetics; with the development of embryo freezing, the possibility of mobilizing animals between countries with sanitary barriers became a reality. In the last decade with the commercial use of *in vitro* produced embryos (IVPE) the production increased, there are multiple factors that can influence in the results of the ET programs, these factors has very diverse origins: embryo (stage of development, quality, genetic component etc), recipient factors (body score, corpus luteum) external factors (season, animal management). This document will approach the topics associated with the factors that could affect pregnancy rates in ET programs of IVPE.

Key words: Embryo transfer, recipients, cattle, IVPE.

1. linodmv@hotmail.com
2. cjimeneze@unal.edu.co

INTRODUCCIÓN

Las biotecnologías reproductivas han tenido un gran impacto en la zootecnia, desde sus inicios con la inseminación artificial (IA). Esta tecnología, en los años cuarenta, revolucionó la ganadería y fue el primero de una serie de avances en el mejoramiento genético en la producción de ganado bovino que posteriormente se difundió a otras especies zootécnicas (1). Thibier (1) divide la historia de las biotecnologías reproductivas en cuatro generaciones, en donde la producción de embriones *in vitro* es tercera después de la IA y la transferencia de embriones (TE), y anterior a la transgénesis. En Colombia, la TE se ha utilizado como herramienta de mejoramiento durante los últimos 20 años, y desde hace 10 se inició la producción comercial a través de técnicas *in vitro* (PIV). El uso de la TE ha posicionado a Colombia como productor de ganado élite, especialmente de la raza Brahman, debido a la aceleración en el mejoramiento genético.

Actualmente, la bibliografía especializada en reproducción confirma que la TE con embriones PIV avanza a un ritmo acelerado, mientras la TE convencional está en declive por lo que en el futuro cercano la PIV se puede convertir en la técnica preferida por los ganaderos para sus programas de mejoramiento genético. La eficiencia en la TE está dada por el costo de producir una cría viva. Por consiguiente, el objetivo del presente artículo es analizar los factores que afectan las tasas de preñez y la eficiencia de los programas de TE. A la vez, discutir ciertos factores desde el punto de vista comercial y su posible incidencia en la eficiencia y en la aplicación de la técnica.

FACTORES QUE AFECTAN LA PREÑEZ EN PROGRAMAS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

Los factores que podrían afectar los resultados de las tasas de preñez tienen diversos orígenes. Kafi y McGowan (2) los clasifican en intrínsecos y extrínsecos. A pesar de que su revisión se refiere a factores que afectan la respuesta superovulatoria en las vacas, estos factores también afectan los índices reproductivos; por tanto, la forma usada por este autor para agrupar los factores fue empleada en este trabajo para los factores que afectan la tasa de preñez en receptoras.

Factores extrínsecos

Estos son los factores que se relacionan con la ecología que rodea al animal, incluye factores que afectan de alguna manera el desempeño o el bienestar, ejerciendo diferentes tipos de presión que modifican la fisiología del individuo.

Ambientales. El medioambiente como elemento constante en todo tipo de producción pecuaria ejerce influencias positivas y negativas sobre los organismos. Esto se ve claramente expresado en los animales de zonas subtropicales, que tienen un ciclo reproductivo activo solo durante una época del año. Los factores ambientales pueden afectar los porcentajes de preñez en las fincas; dentro de éstos, el estrés calórico ha sido uno de los factores que más se ha estudiado. Franco et ál. (3) encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,02$) en programas de inseminación artificial (IA) para novillas Holstein en el estado de la Florida, Estados Unidos: 21,4% (40/187) para los meses de octubre, noviembre, febrero y marzo; y 13,5% (39/290) para los meses de calor (mayo-septiembre) (tabla 1).

TABLA 1. Tasas de preñez en programas de inseminación artificial agrupados por periodos de calor y frío (3).

Temporada	n	Preñez (%)	Valor -p
Oct., Nov., Feb., Mar.	187	21,4	(p=0,02) ^a
May.-Sep.	290	13,5	

^aX².

Si bien estos datos son de programas de IA, este índice reproductivo puede ser un indicador de posibles alteraciones en las tasas de preñez en programas de TE. Sin embargo, no todos los autores reportan cambios en la fertilidad de las hembras con relación a las diferentes épocas del año. Hasler (4), en un estudio sobre los factores que afectan la preñez por TE convencional, no encontró diferencias (p>0,05) en los porcentajes de preñez para las diferentes estaciones: primavera 68,8% (n=2718), verano 67,7% (n=2004), otoño 67,8% (n=1907) e invierno 68,5% (n=2394) (tabla 2).

TABLA 2. Tasa de preñez para embriones transferidos en fresco; análisis por estaciones (4).

Estación	n	Preñez (%)
Primavera	2.718	68,8
Verano	2.004	67,7
Otoño	1.907	67,8
Invierno	2.394	68,5

Block y Hansen (5), en un estudio con embriones PIV, analizaron el efecto del factor de crecimiento asociado a la insulina tipo 1 (IGF-1) adicionado al medio de cultivo en las temporadas de calor y frío, y encontraron que en el grupo control no hay diferencias significativas entre temporadas: 24,4% (11/45) en la temporada fría frente a 18,3% (13/71) en la temporada cálida. Y en el

grupo experimental diferencias estadísticas (p<0,05): 26,2% (11/42 IGF-1) en la temporada fría frente a 41,8% (28/67 IGF-1) en la temporada cálida. Esto sugiere que hay un efecto positivo del IGF-1 sobre los embriones PIV bajo estrés calórico que mejora la sobrevivencia postransferencia. De los datos anteriores se puede especular que podría existir un efecto entre temporadas cálidas comparadas con las temporadas frías por estrés térmico de los embriones PIV, que no fue detectado por el modelo estadístico usado, probablemente por la cantidad de datos analizados.

Chebel et ál. (6), en otro estudio con embriones de raza Holstein tanto en PIV como por superovulación, analizaron el efecto de la estación sobre las tasas de preñez y encontraron diferencias (p<0,05) para las tasas de preñez de novillas transferidas en verano (52%, 120/231) comparadas con las transferidas en invierno (55,8%, 531/952). De manera opuesta, cuando transfirieron en vacas no encontraron diferencia entre estaciones (p>0,05): verano 82,5% (189/229), invierno 83,5% (116/139). Estos resultados sugieren que hay una posible mejor adaptación al medioambiente de los animales de mayor edad (vacas) que en teoría podrían enfrentar las condiciones de estrés climático de mejor manera que los animales jóvenes (novillas). Parece que las estaciones o las diferentes épocas del año podrían afectar los resultados en trabajos de inseminación artificial, pero aparentemente no afectarían en mayor medida los programas de TE. Esto puede ser debido a que los animales pertenecientes a programas de TE, en la práctica, tienen prelación sobre otros grupos en las épocas de deficiencia alimentaria, por consiguiente

estos son los últimos en verse afectados en las crisis alimentarias.

Factores de manejo y administrativos. En las diferentes explotaciones es normal que se presenten diferencias administrativas que alteren los resultados de los programas, como por ejemplo, el tipo y la cantidad de suplementación mineral que se suministra, la disponibilidad de forraje verde en poteros, la disponibilidad de forraje almacenado tipo silo o heno, el estrés causado por malas prácticas de manejo como golpes en exceso al conducir los animales o en los corrales. Según Thatcher et ál. (7) los factores de manejo que pueden afectar los resultados de un programa de transferencia de embriones son los relacionados con: alimentación, estrés de los animales y condiciones que afecten el bienestar. Stroud y Hasler (8) estudiaron algunos de los factores que en la finca pueden afectar el éxito de un programa de TE; analizaron los programas de inseminación artificial (IA) en vacas, en novillas y programas de TE de cuatro fincas (A, C, D y E), y encontraron diferencias

significativas entre ellas ($p < 0,05$, A^a, C, C^c D^c y E), aun donde el mismo grupo de técnicos realiza los procedimientos. Estas diferencias fueron atribuidas a factores de manejo y organización de las explotaciones (figura 1). Se encuentra que existe un efecto del manejo entre las explotaciones, como las relacionadas con la experiencia del equipo de la finca en cuanto a manejo de ganado bovino, además de las dificultades de algunas instalaciones como corrales que causan estrés elevado de manejo. Los diferentes tipos de administración de las explotaciones pueden o no proporcionar ambientes confortables, por ejemplo, la disponibilidad de sombrero y agua fresca en los poteros. Todos estos factores ejercen una presión decisiva en los resultados que, sumados, son uno solo: el manejo de la finca. Además de los factores ya nombrados, la técnica exige manejo adicional para desarrollar los protocolos de sincronización de celos que idealmente deben tener la menor cantidad posible de entradas al corral para reducir al máximo el estrés causado.

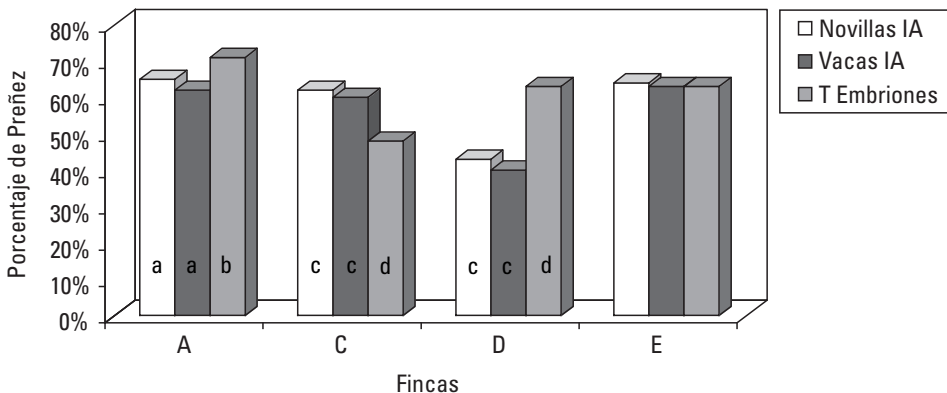


FIGURA 1. Análisis de los resultados de programas de inseminación artificial y transferencia de embriones comparando tres diferentes fincas (8).

Nota: entre fincas los porcentajes difieren significativamente ab $P < 0,025$, cd $P < 0,001$.

Nutricionales. El balance nutricional (energía, proteína, vitaminas, minerales y agua) debe ser el adecuado y se mide a través de la condición corporal (CC). La CC ejerce una influencia marcada sobre las tasas de preñez, pues las mejores tasas se obtienen cuando los valores son intermedios, de 2 a 3 en la escala de 1 a 5 (5 es obeso y 1 es caquéctico) (8). En receptoras de embriones con estas condiciones corporales se reportan tasas de preñez entre 53 y 55%, y son inferiores para las condiciones extremas de 1 y 4 o más (44 y 47% respectivamente) (9). Estos hallazgos coinciden con los obtenidos por Flores et ál. (10), quienes al evaluar la ciclicidad por medio de radiotelemetría en ganado cruzado con Brahman (1/4 a 3/8 Brahman) de diferentes CC, compararon días abiertos y tasa de presentación de celos postsincronización con implante intravaginal, encontrando unos mejores índices en los animales con CC moderado: 64% de presencia de celos para animales de baja CC contra 82% en animales de CC moderada. Al-Katanani et ál. (11) encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las tasas de preñez entre grupos de diferente CC: $\leq 2,5$ y $> 2,5$, para programas de inseminación a tiempo fijo (IATF), y TE, hallando porcentajes de preñez diferentes entre los grupos: 15,6 y 5,5% respectivamente. Estos resultados fueron obtenidos en ganado lechero y en producción.

Factores intrínsecos

Los factores intrínsecos son los propios del animal que afectan la tasa de preñez y están directamente relacionados con la fisiología del animal o con el embrión.

Diámetro del cuerpo lúteo. 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 (12). 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 (13). 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. Binelli et ál. (14), 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. En el estudio mencionado se obtuvieron los siguientes resultados en concentraciones de progesterona (ng/ml) el día 13: 4,79 (+/- 2,79), 8,42 (+/- 3,64), 6,07 (+/- 3,09) para GnRH, hCG y LH respectivamente. Concluyeron que con el uso de estas hormonas se eleva la cantidad de receptoras aptas para recibir un embrión en la evaluación postsincronización, comparado con el grupo control sin tratamiento. De manera similar, otros autores han diseñado protocolos que buscan favorecer la formación de uno o más cuerpos lúteos. Nasser et ál. (15) compararon cuatro protocolos de sincronización en novillas receptoras *Bos indicus* x *Bos taurus* (F1). Un grupo fue tratado con gonadotropina coriónica

equina (eCG) el día 5 u 8 del protocolo de sincronización con dispositivos intravaginales de liberación de progesterona (PRID). Paralelamente, se llevó a cabo un estudio en el que se determinaba el efecto de la administración de progesterona inyectable (P4) en el momento del implante con el dispositivo de progesterona. El estudio no mostró diferencias entre los tratamientos con y sin progesterona, mientras que el tratamiento con eCG incrementó estadísticamente la cantidad de cuerpos lúteos (1,32^a eCG día 5, 1,03^b eCG día 8, 1,37^a eCG día 5+P4 y 1,22^{a,b} eCG día 8+P4), mientras que para la tasa de preñez no hubo diferencia significativa entre los grupos eCG día 5 (38/75, 50%), eCG día 8 (30/75, 40%), eCG día 5+P4 (33/76, 43%) y eCG día 8+P4 (31/75, 41%). En otro estudio, Nogueira et ál. (16) reportan que un incremento en la concentración de progesterona no mejora las tasas de preñez en programas de TE. En ese estudio se administró eCG a tres grupos (control sin eCG, 200 UI, 400 UI y 600 UI). A pesar de que se aumentaron las concentraciones plasmáticas de progesterona (3,93 ng/ml, 4,24 ng/ml, 5,95 ng/ml y 7,81 ng/ml respectivamente), no hubo cambios significativos en las tasas de preñez (41,9; 50,0; 25,0 y 20,9%), e incluso se observó una tendencia a la disminución en las mismas.

Barceló-Fimbres et ál. (17) no encontraron diferencias en la tasa de preñez ($p>0,10$) cuando se transfieren embriones PIV en receptoras que al momento de la transferencia tenían cuerpos lúteos sólidos ($n= 47$) frente a receptoras con cuerpos lúteos cavitarios observados por ultrasonografía ($n= 26$; tasas de preñez de 34 y 46% respectivamente). Los anteriores hallazgos sugieren que el cuerpo

lúteo con cavidad podría tener la misma actividad de producción de progesterona sin afectar tasas de preñez. En conclusión, el uso de estrategias para manipular la producción de progesterona, ya sea por aumento de tamaño o por la formación de varios cuerpos lúteos, si bien no mejora de manera significativa las tasas de preñez, muestra una leve tendencia a aumentarlas. Es importante resaltar que estos tratamientos tienen un efecto benéfico en cuanto a la eficiencia de la sincronización, favoreciendo que un mayor porcentaje de receptoras se encuentren aptas al momento de la transferencia.

Factores asociados al embrión. La observación y clasificación de los embriones por transferir es esencial en los trabajos de TE. Tanto los embriones PIV como los de TE convencional tienen la misma dinámica de desarrollo, y los parámetros de clasificación se pueden aplicar de igual forma en cualquiera de los dos procesos. Las diferencias morfológicas están dadas porque el desarrollo del embrión PIV es ligeramente más rápido que el de TE convencional; prueba de esto es que embriones de día-7 PIV son principalmente blastocitos expandidos, mientras que en el convencional este mismo día se encuentran mayormente blastocitos tempranos (18, 19).

Chebel et ál. (6) analizaron los factores que influyen en la recolección y transferencia de embriones PIV o por superovulación en la raza Holstein —incluyeron la calidad del embrión transferido en el estudio—, encontrando diferencias significativas ($p<0,01$): 59,4% (443/746) de preñez para los embriones calidad 1, 53,8% (157/292) para los embriones calidad 2, y 35,2% (51/145) para los embriones transferidos calidad 3; vale la pena anotar que el autor no

especifica el origen de los embriones (superovulación o PIV).

Estado de desarrollo. Se ha conocido por mucho tiempo que la calidad y el desarrollo del embrión ejercen una marcada influencia sobre los resultados de la TE. La transferencia de una mórula temprana resulta en menores tasas de preñez que cuando se transfieren embriones en estadio más avanzado (9). Hasler (4) reporta tasas de preñez estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para embriones de calidad 1 (73,2%), 2 (68,3%) y 3 (56,3%), pero no reporta diferencias entre diversos estadios de desarrollo. Esto puede ser explicado debido a que al transferir un embrión cuyo desarrollo haya sido más rápido, este podría expresar más rápidamente los factores de reconocimiento de preñez, comparado con un contemporáneo de menor desarrollo. Esto puede estar soportado por el trabajo de Block y Hansen (5), quienes encuentran diferencias significativas en secreción de Interferón-tau en embriones de diferente tamaño, hallando una correlación positiva entre el tamaño del embrión y la producción de Interferón-tau ($r = 0,5$; $p < 0,001$).

En otro trabajo, Scenna et ál. (20) asociaron la calidad y el desarrollo del embrión con las tasas de preñez cuando compararon el grupo control contra el grupo experimental (tratamiento con un inhibidor de síntesis de prostaglandinas). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) para la preñez del grupo experimental; vale la pena resaltar que el modelo estadístico aparentemente no comparó las tasas de preñez dentro de cada grupo para calidad o desarrollo del embrión, pero se observa que la preñez tuvo la tendencia a ser mayor para embriones de calidad 1: 64,5% con-

trol (322/499) y 66,9% experimental (572/856) comparados con los embriones de calidad 2: 53,5% (122/228 control) y 64,2% (224/349 experimental). Esta tendencia también fue observada a favor de los blastocitos para estado de desarrollo del embrión: blastocito 59,5% control (219/369) y 66% experimental (413/626) comparados con mórula 58,9% control (248/421) y 64,5% experimental (434/674).

Block et ál. (21), estudiando cambios en los componentes del cultivo para producir embriones PIV de raza Holstein, evaluó el efecto de añadir el glicosaminoglicano, ácido hialurónico en el medio de cultivo SOF (fluido oviductual sintético) en diferentes concentraciones (0; 0,1; 0,5 o 1 mg/ml) durante el proceso de producción de los embriones; sobre los embriones transferidos analizaron las diferencias en tasas de preñez dependiendo del estadio de desarrollo al momento de la transferencia. Encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) para la preñez con mórulas: 18,5% (15/81, control) y 28,6% (20/70, ácido hialurónico) comparada con la de blastocitos expandidos: 38,3% (31/81, control) y 29,5% (23/78, ácido hialurónico). Si bien existe una clara tendencia a que la tasa de preñez en embriones de calidad excelente y en embriones de mayor desarrollo sea mejor, en la aplicación comercial de la técnica no siempre es recomendable transferir solo embriones de calificación excelente o solo embriones de desarrollo avanzado. El resultado final de la aplicación de la técnica es cantidad total de animales preñados y no tasa de preñez; para el criador es mejor una buena cantidad de preñeces sacrificando la tasa, que una buena tasa de preñez con pocos animales preñados.

Toros. Debido a que el genotipo y fenotipo del embrión son diferentes de la madre y el padre, se podría especular que podrían existir diferencias en las tasas de preñez de embriones de acuerdo con el padre. En la literatura revisada no se encontró evidencia de que el toro usado para embriones PIV afecte la tasa de preñez; sin embargo, Blondin et ál. (22), estudiando el efecto de la heparina en el proceso de fertilización en oocitos bovinos, usaron espermias convencionales como sexados, evaluaron si existían diferencias entre ellos y, además, compararon diferentes toros y su producción de blastocitos PIV. Estos autores encontraron que la producción de embriones con semen convencional es diferente ($p < 0,05$) a la producción de embriones con semen sexado (22,2 y 10,6% respectivamente); también encontraron que si comparaban las producciones de embriones (blastocitos / oocitos viables) por toros había también diferencias significativas ($p < 0,05$): toro A=12,7%, toro B=17,5% y toro C=8,8%.

Fernandes et ál. (23) estudiaron el efecto del estrés térmico sobre los testículos de toros de la raza Nelore (*Bos indicus*) sin encontrar diferencias para producción de blastocitos PIV entre los toros estudiados ($p > 0,05$) antes del aislamiento térmico de los testículos. Después del día 7 del aislamiento térmico, se comienzan a observar diferencias en producción de blastocitos PIV entre los animales ($p < 0,05$): toro A, 14%^a; toro B, 22,2%^a; toro C, 16,8%^a, y toro D, 3,8%^b. Este cambio es explicado por los autores comparando los defectos de los espermatozoides con la tasa de producción de blastocitos, encontrando que las variables de morfología de los espermatozoides relacionadas con la producción

son: acrosoma intacto ($p = 0,0019$), defectos de cabeza ($p = 0,0120$), vacuolas nucleares ($p = 0,0162$), cromatina anormal ($p = 0,0179$), y concluyen que la morfología de los espermatozoides está relacionada con la eficiencia de producción de embriones PIV, por lo que sugieren la inclusión de protocolos de identificación de problemas morfológicos que predigan los resultados antes de usar los toros.

Xu (24), estudiando los efectos del uso de semen sexado en la producción de embriones y en la preñez de TE de embriones PIV, encontró diferencias ($p < 0,05$) para la producción de blastocitos entre 4 toros Holstein sexados. Se comparó la tasa de preñez contra embriones PIV y embriones obtenidos por superovulación, *in vivo*. Las tasa de preñez de los tres grupos fue similar entre ellos (40,9% semen sexado $n = 3627$, 41,9% no sexado $n = 481$, 53,1% embriones *in vivo* $n = 192$). Además, compararon las tasas de preñez de los toros de mayor producción de embriones encontrando que son similares entre ellas ($p > 0,05$). Este último hallazgo podría estar sesgado debido al hecho de que sólo se comparan los embriones producidos por los mejores toros en cuanto a producción de embriones; queda la duda sobre qué hubiera sucedido si se comparan las preñeces de todos los toros. Se puede especular que si bien existen diferencias en la producción por toro de embriones PIV, también podría haber diferencias en las tasas de preñez. Pero en la bibliografía consultada no se encontraron evidencias de esto.

Dificultad al momento de la transferencia. El hecho de depositar un embrión en el interior del cuerno uterino supone una invasión del tracto reproduc-

tivo; este procedimiento está asociado a posibles lesiones del endometrio y a la consecuente producción de PGF₂-alfa, lo que reduciría los índices de preñez (20). Barceló-Fimbres et ál. (17), , analizaron los efectos de la dificultad al momento de la transferencia sobre la tasa de preñez, entre otros factores, en embriones PIV. 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 o 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.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En esta revisión se encontró que son muy variados los factores que pueden afectar las tasas de preñez en programas de TE, también se encontró que existe poca documentación sobre trabajos realizados en ganado cebuino al respecto, y casi nula la información recopilada en zonas tropicales.

Por esto, para los autores es de suma importancia la realización de estudios de TE dirigidos a razas cebuinas, donde se busque estudiar cada uno de estos factores limitantes para determinar en la práctica el impacto real sobre las tasas de preñez y, de esta manera, concentrar los esfuerzos de control de calidad sobre algunas variables, de acuerdo con la prioridad determinada por los futuros estudios.

REFERENCIAS

1. Thibier M. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod Nutr Dev* 2005; 45: 235-242.
2. Kafi M, McGowan M. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim Reprod Sci* 1997; 48: 137-157.
3. Franco M, Thompson PM, Brad AM, Hansen PJ. Effectiveness of administration of gonadotropin-releasing hormone at Days 11, 14 or 15 after anticipated ovulation for increasing fertility of lactating dairy cows and non-lactating heifers. *Theriogenology* 2006; 66 (4): 945-54.
4. Hasler J. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 2001; 56: 1401-1415.
5. Block J y Hansen PJ. 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* 2007; 67: 1518-1529.
6. Chebel RC, Demétrio DGB, Metzger J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology* 2008; 69: 98-106.
7. Thatcher WW, Moreira F, Santos JEP, Mattos RC, Lopes FL, Pancariland SM, Risco CA. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 2001; 55: 75-89.
8. Stroud B, Hasler JF. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology* 2006; 65 (1): 65-76.
9. Looney CR, Nelson JS, Schneider HJ, Forrest DW. Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology* 2006; 65 (1): 201-9.
10. Flores R, Looper ML, Rorie RW, Lamb MA, Reiter ST, Hallford DM, Kreider DL and Rosenkrans CF Jr. Influence of body condition and bovine somatotropin on estrous behavior, reproductive performance, and concentrations of serum somatotropin and plasma fatty acids in postpartum Brahman-influenced cows. *J Anim Sci* 2007; 85: 1318-1329.

11. Al-Katanani YM, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Krininger III CE, Blockb J, Thatcher WW, Hansena PJ. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology* 2002; 58: 171-182.
12. Vasconcelos JL, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 2001; 56 (2): 307.
13. Shah KD, Maeda T, Hidaka T, Ogata Y. Estrone sulfate and progesterone profiles during late gestation in recipient cows transferred embryos produced by nuclear transfer and *In vitro* fertilization. *J Reprod Dev* 2007; 53 (6): 1237-46.
14. Binelli M, Thatcher WW, Mattos R, Baruselli PS. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 2001; 56 (9): 1451-63.
15. Nasser LF, Reis EL, Oliveira MA, Bo GA, Baruselli PS. Comparison of four synchronization protocols for fixed time embryo transfer in *Bos indicus* x *Bos Taurus* recipients. *Theriogenology* 2004; 62 (9): 1577-84.
16. Nogueira MF, Melo DS, Carvalho LM, Fuck EJ, Trinca LA, Moraes Barros C. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2a and eCG? *Theriogenology* 2004; 61: 1283-1290.
17. Barceló-Fimbres M, Brink Z, Seidel GE Jr. Effects of phenazine ethosulfate during culture of bovine embryos on pregnancy rate, prenatal and postnatal development. *Theriogenology* 2009; 71: 355-368.
18. Palma G. *Biotechnología de la Reproducción*. Argentina: Ediciones INTA; 2001. pp. 265-266.
19. Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. Ultrastructural morphology of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod* 2001; 64 (5): 1375-85.
20. Scenna FN, Hockett ME, Towns TM, Saxton AM, Rohrbach NR, Wehrman ME, Schrick FN. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005; 78 (1-4): 38-45.
21. Block J, Bonilla L, Hansen PJ. Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos in vitro following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. *Theriogenology* 2009; 71: 1063-1071.
22. Blondin P, Beaulieu M, Fournier V, Morin N, Crawford L, Madan P, King WA. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology* 2009; 71: 30-38.
23. Fernandes CE, Dode MAN, Pereira D, Silva AEDF. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. *Theriogenology* 2008; 70: 1560-1568.
24. Xu J, Chaubal SA, Du F. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology* 2009; 71: 39-47.