

Factores que afectan la tasa de preñez en receptoras de embriones producidos *in vitro* bajo condiciones de altura

Factors affecting pregnancy rate in recipients of embryos produced *in vitro* under high altitude conditions

Manuel Guido Pérez Durand¹, Teófilo Béjar Huaylla¹, Yesenia María Quispe Barriga¹,
Eliseo Pelagio Fernández Ruelas², María Antonieta Flores Guillen³,
Alfredo Delgado Castro^{4,5}, Uri Harold Pérez Guerra¹

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar los factores que afectan la preñez en hembras receptoras de embriones producidos *in vitro* bajo condiciones de altura. El estudio se llevó a cabo en la Universidad Nacional del Altiplano (UNA), ubicada en Puno, Perú, a una altitud de 3970 m. Se utilizaron 50 hembras receptoras (nulíparas, primíparas y multíparas) Brown Swiss. Se colectaron ovarios de vacas sacrificadas en un centro de beneficio local y se llevaron al laboratorio de reproducción animal de la UNA, donde se colectaron los ovocitos, y se procedió con la maduración y fertilización *in vitro*, cultivo y evaluación de embriones. El tiempo de transporte hasta el laboratorio fue de 2 a 3 h. Se evaluaron factores cuantitativos como condición corporal (CC), diámetro de cuerpo lúteo (CL) y número de partos, y factores cualitativos como lugar de depósito del embrión

¹ Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano de Puno, Perú

² Laboratorio de Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano de Puno, Perú

³ Laboratorio de Genética y Mejoramiento Genético, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Los Andes, Huancayo, Perú

⁴ Clínica de Animales Mayores, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

⁵ E-mail: adelgadoc@unmsm.edu.pe

Recibido: 2 de marzo de 2021

Aceptado para publicación: 15 de noviembre de 2021

Publicado: 29 de junio de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

(cuerno derecho o izquierdo) y calidad de embrión, mediante la prueba de Wilcoxon y Chi cuadrado, respectivamente. Asimismo, se aplicó una regresión logística binaria para el estudio de todos los factores en conjunto. La mayor tasa de preñez se presentó cuando las receptoras tenían 2.65 de CC, 19.54 mm de diámetro de CL y en primíparas como factores cuantitativos y cuando se transfirió al cuerno ipsilateral izquierdo (9/12) con embriones de grado 1 (G1: 11/17) como factores cualitativos. No obstante, el modelo de regresión logística binaria no determinó significancia en conjunto.

Palabras clave: embrión, *in vitro*, preñez, transferencia de embriones, altura

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the factors that affect pregnancy in recipient females of embryos produced *in vitro* under high altitude conditions. The study was carried out at the Universidad Nacional del Altiplano (UNA), located in Puno, Peru, at an altitude of 3970 m. 50 recipient females (nulliparous, primiparous and multiparous) Brown Swiss were used. Ovaries were collected from cows at a local slaughterhouse and taken to the UNA animal reproduction laboratory, where the oocytes were collected, and *in vitro* maturation and fertilization, culture and embryo evaluation were carried out. The transport time to the laboratory was 2 to 3 h. Quantitative factors such as body condition score (CC), diameter of the corpus luteum (CL) and number of parities, and qualitative factors such as the place of deposit of the embryo (right or left horn) and embryo quality, were evaluated using the Wilcoxon and Chi test. square, respectively. Likewise, a binary logistic regression was applied to study all the factors together. The highest pregnancy rate occurred when the recipients had a 2.65 CC, 19.54 mm CL diameter and in primiparous as quantitative factors and when transferred to the left ipsilateral horn (9/12) with grade 1 embryos (G1: 11/ 17) as qualitative factors. However, the binary logistic regression model did not determine significance as a whole.

Key words: embryo, embryo transfer, *in vitro*, pregnancy, high altitude

INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones (TE) es una herramienta importante dentro del manejo reproductivo y la mejora genética del ganado bovino, introduciendo características favorables de individuos de alto valor genético para incrementar el rendimiento de establos lecheros; adicionalmente, puede mejorar la fertilidad de vacas con estrés de calor o de vacas repetidoras (Drost *et al.*, 1999; Hasler, 2001). La TE como técnica incluye la producción de embriones *in vivo* mediante un proceso previo de multiovlulación y colección

de embriones en la hembra, mientras que la producción de embriones *in vitro* se desarrolla enteramente en laboratorio (Palma, 2008b).

Para la producción de embriones *in vitro* se utilizan ovocitos aspirados de ovarios de vacas de los centros de beneficio o de vacas en pie mediante la aspiración folicular guiada por ultrasonografía (Hasler, 2014). La técnica de producción de embriones *in vitro* mediante la aspiración de ovocitos en hembras en pie de alto valor genético y el uso semen sexado incrementa el progreso genético para la mayor producción lechera

(Pontes *et al.*, 2010; Blondin, 2017). La industria de producción de embriones para el 2018 reporta que el 96.7% del millón y medio de transferencias de embriones realizadas en ese año se realizaron en vacas dedicadas a la producción lechera (Viana, 2018).

Las tasas de concepción con embriones frescos o congelados producidos *in vitro* se ven afectados por factores tales como la estación del año, la hembra receptora, el estado y calidad del embrión, la sincronización del celo de la receptora, el tamaño de cuerpo lúteo (CL) y la condición corporal (Hasler, 2001; Peixoto *et al.*, 2007; Gonella *et al.*, 2013; Ferraz *et al.*, 2016). Asimismo, las tasas de gestación son mayores al transferir embriones de producción *in vivo* en comparación con embriones producidos *in vitro* (Pérez-Mora *et al.*, 2020). De otra parte, las condiciones de crianza en altura generan interrogantes sobre los factores que afectan la preñez de las hembras receptoras tras la transferencia de embriones producidos *in vitro*, de allí que el objetivo del presente estudio fue determinar los factores que afectan la tasa de preñez en hembras receptoras de embriones producidos *in vitro* en condiciones de altura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar del Estudio y Animales

La colección de ovarios fue realizada una vez por semana durante tres meses en un centro de beneficio privado ubicado en la ciudad de Puno. Los animales donadores de ovarios fueron vacas de descarte, adultas, no gestantes, de raza Brown Swiss. La producción de embriones *in vitro* se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano (UNA), Puno. La transferencia de embriones se realizó en 50 hem-

bras receptoras (nulíparas, primíparas y multíparas) Brown Swiss con el tracto reproductivo aparentemente normal (previa evaluación ginecológica y ultrasonográfica). El sistema de manejo fue extensivo y con alimentación mixta (pastos naturales y cultivados) y los animales pertenecían a productores del distrito de Macari, provincia de Melgar, departamento de Puno, Perú, zona ubicada a más de 150 km del laboratorio y a una altitud de 3970 m.

Producción de Embriones *in vitro*

El proceso de producción de embriones *in vitro* fue realizado según Suzuki *et al.* (1999) y Vajta *et al.* (1997), utilizando una incubadora portátil, sistema que fue adecuado por Pérez *et al.* (2019a), teniendo los siguientes pasos:

Transporte de los ovarios y colección de ovocitos:

Los ovarios fueron llevados desde el centro de beneficio al laboratorio en un lapso de 2 a 3 h, en solución salina (0.9% NaCl adicionada con 50 µg de gentamicina/ml) en una bolsa de polietileno sumergida en agua temperada a 30-35 °C dentro de un termo. Los ovarios fueron lavados tres veces con solución salina (37 °C) previo a la colección de los ovocitos. Se aspiraron folículos entre 3 y 8 mm con una aguja 20G x 1" con una jeringa de 10 ml y el contenido aspirado fue colocado en un vial de 15 ml que estaba dentro de un equipo de baño maría. Luego de 10 min de reposo se eliminó el sobrenadante y el sedimento fue vertido en una placa Petri (30x10 mm) para evaluar los ovocitos bajo un estereoscopio a 40X (Leica S8APO, Alemania). Se seleccionaron ovocitos de grado A (Complejos cumulus oophorus [COCs] con masa compacta con al menos 4 a 5 capas de células y citoplasma homogéneo) y B (COCs con 2 a 3 capas de células del cumulus adherida a la zona pelúcida y con citoplasma homogéneo) (Singh *et al.*, 2017).

Maduración de ovocitos y fertilización in vitro:

La maduración se realizó de acuerdo con el protocolo recomendado por Pérez *et al.* (2019a). Se colocaron de 20 a 30 ovocitos por pozo y fueron lavados en tres oportunidades con el medio de maduración (TCM 2520 Sigma®), suplementado con 0.2 mM de piruvato de sodio, 0.5 mM de bicarbonato de sodio, 10% de suero fetal, 10 µl de anfoterecina B/ml, 10 UI/ml de gonadotropina coriónica equina [Novormon®, Sintex, Argentina], 5 UI/ml de gonadotropina coriónica humana [Pregnyl®N.V. Organon]). Luego, los ovocitos se introdujeron en 500 µl del medio de maduración en placas Petri de 4 pozos cubiertas con aceite mineral. Los ovocitos fueron mantenidos por 24 h a 38.5 °C, 5% de CO₂ y alta humedad (80-90%) dentro la incubadora portátil sumergida en baño maría.

La fertilización *in vitro* (FIV) se realizó según protocolo de Parrish *et al.* (1986) con ligeras modificaciones acordes al Laboratorio de Reproducción Animal, UNA (Pérez *et al.*, 2019a), utilizando el medio Fert-TALP. Se utilizó semen congelado en pajilla de 0.5 ml de un solo toro de raza Brown Swiss de origen nacional para evitar el efecto macho, los espermatozoides fueron seleccionados por *swim-up* en Sperm-TALP y después de centrifugarlos y re-supenderlos se determinó la motilidad y se ajustó la concentración a 1 x 10⁶/ml. De este volumen se colocó 10 µl (aproximadamente 10 000 espermatozoides motiles) a cada pozo de fertilización (500 µl). El proceso de fertilización fue por 18 h dentro la misma incubadora portátil con las mismas condiciones realizadas para la maduración de los ovocitos.

Cultivo y Evaluación de Embriones

Los presuntos cigotos fueron desnudados (Vajta *et al.*, 1996), siendo trasladados a un tubo de ensayo de vidrio de 15 ml de capacidad que contenía 500 µl de medio de cultivo mSOFaa (Tervit *et al.*, 1972). El contenido se homogenizó en el vórtex (Vibramix

VM3E, Ovan®, España) a su máxima revolución (2600 rpm) por 30 s y luego el contenido se vertió a una placa Petri (30 x10 mm). El tubo se enjuagó tres veces con el mismo medio y los presuntos cigotos recuperados también fueron lavados tres veces con el medio de cultivo (mSOFaa). Se les traspasó a placas Petri que contenían en cada pozo 500 µl de mSOFaa suplementando con 5% de suero fetal (previamente equilibradas 2 h antes). Las placas se acondicionaron dentro la incubadora portátil, cambiando de medio de cultivo cada tres días. Luego de 72 h de la fertilización se determinó el número de embriones fertilizados y a los 7 días pos-cultivo se determinó el estado de desarrollo embrionario utilizando el estereoscopio a 80X.

Receptoras

Se verificó que las receptoras (nulíparas, primíparas y multíparas) tuvieran un ciclo estral completo antes de la transferencia. Asimismo, se registraron las siguientes características:

- *Factores cuantitativos:* Condición corporal (1 al 5, donde 1= muy delgado y 5= con exceso de peso); diámetro del cuerpo lúteo (CL) medido mediante ultrasonografía (promedio del diámetro mayor y menor, mm); número de partos según los registros de los productores.
- *Factores cualitativos:* Lugar de depósito del embrión (cuerno derecho o izquierdo según la posición del CL); calidad de embrión (grado 1 [G1] y grado 2 [G2]), según Palma (2008a).

Transferencia de Embriones

El proceso de producción y transferencia de embriones se realizó de acuerdo con lo indicado en la Figura 1.

El transporte de los embriones se realizó en pajillas de 0.25 ml (colocando un embrión G1 o G2) conteniendo medio mSOFaa suplementado con 20% de suero fetal. Las pajillas rellenas con el medio y el embrión

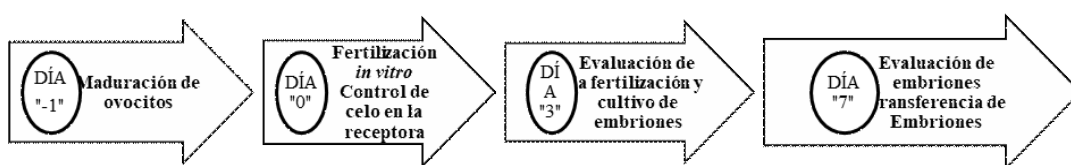


Figura 1. Proceso de producción de embriones *in vitro* y transferencia de embriones en vacas Brown Swiss criadas en altura

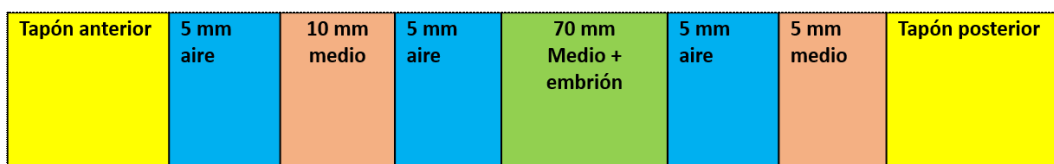


Figura 2. Disposición de la pajilla transportada con el embrión para la transferencia de embriones

(Figura 2) fueron protegidas con papel toalla y colocadas de forma horizontal dentro una caja de poliestireno expandido (Tecnopor®) pequeña (19x11.5 cm y 7.5 cm de alto) manteniendo una temperatura de 15-16 °C. El tiempo de transporte entre el laboratorio hasta el lugar de transferencia fue alrededor de 4 h. La disposición del embrión transportado se muestra en la Figura 2.

Todas las transferencias de embriones fueron hechas a los 7 días de haberse detectado el celo. Este fue sincronizado previamente con el protocolo de Pre-Synch (dos aplicaciones de prostaglandina F_{2α} [D-Closprostenol, Prostal, Over, Argentina] en dosis de 2.5 ml/animal/aplicación). Para la transferencia se sujetó a la vaca recipiente y se realizó la limpieza y desinfección de la vulva, así como se aplicó anestesia epidural (Lidocaína 2%, 4 ml, Vetocaína A2, AgrovvetMarket®). Se determinó el tamaño y posición del CL mediante ultrasonografía con un equipo portátil (DRAMINSKI 4Vet Slim®, Polonia) con 6 MHz de frecuencia equipado con un transductor lineal transrectal.

La pajilla fue colocada en el aplicador para TE protegido con una camiseta sanitaria, el aplicador se pasó a través del cervix hasta llegar al cuerno ipsilateral del CL donde fue depositado (Bó y Mapletoft, 2018; Palma, 2008b). El diagnóstico de preñez se realizó mediante ultrasonografía a los 30 y 60 días posteriores a la TE determinando la presencia del concepto y del feto.

Análisis Estadístico

Los datos fueron sometidos a estadística descriptiva (promedio y desviación estándar) para los factores cuantitativos de condición corporal (escala de 1 a 5), diámetro de cuerpo lúteo (CL, mm) y número de partos en las receptoras según estado (preñez y no preñez), mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Los factores cualitativos de efecto del lugar de depósito de los embriones en el útero (cuerno derecho o izquierdo) y calidad de embrión (grado 1 y 2) según el estado (preñez y no preñez) fueron evaluadas mediante tablas de contingencia de Chi cuadrado.

Cuadro 1. Factores cuantitativos que intervienen en la preñez de embriones producidos *in vitro* de vacas Brown Swiss criadas en altura (n=50)

	Preñez	No preñez	p valor
Condición corporal (1-5)	2.7 ± 0.4	2.3 ± 0.4	0.022
Diámetro de CL (mm)	19.54 ± 1.33	16.86 ± 2.47	0.00004
Número de partos	1.0 ± 1.3	3.1 ± 1.3	0.00009

Todos los factores en conjunto fueron evaluados mediante una regresión logística binaria (debido a que los datos no poseían el supuesto de homocedasticidad) utilizando la metodología de máxima verosimilitud (Peixoto *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2019b; Vaughan *et al.*, 2013), siendo la variable de respuesta el evento binomial de preñez y no preñez. Los análisis fueron realizados mediante el programa estadístico R 4.0.2 con el paquete *Rcmdr* (R Core Team, 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tasa de concepción en vacas receptoras de embriones producidos *in vitro* fue del 26% (13/50 receptoras), resultado dentro del rango de 20 y 50% reportado en la literatura (Al-Katanani *et al.*, 2002; Block *et al.*, 2010; Gonella *et al.*, 2013; Ferraz *et al.*, 2016), aunque otros estudios reportan resultados superiores con embriones producidos *in vitro* (Colazo y Mapletoft, 2007; Pinaffi *et al.*, 2015) y transferidos a gran escala. El 26% de concepción se debería a la distancia recorrida desde el laboratorio al lugar en que se realizó la transferencia, recorrido que pudo tener un efecto negativo sobre la uniformidad de la temperatura de transporte y el tiempo transcurrido (Ideta *et al.*, 2013).

Factores Cuantitativos en la Preñez

Factores cuantitativos como la condición corporal, el diámetro del cuerpo lúteo (CL) y el número de partos influenciaron significativamente ($p < 0.05$) la tasa de preñez al utilizar embriones de producción *in vitro* (Cuadro 1)

La disminuida condición corporal de las receptoras del estudio podría haber afectado la tasa de preñez. Según Lamb y Mercadante (2014), la condición corporal en receptoras de aptitud lechera debe estar entre 3 y 4, en tanto que Gümen *et al.* (2003) indican que

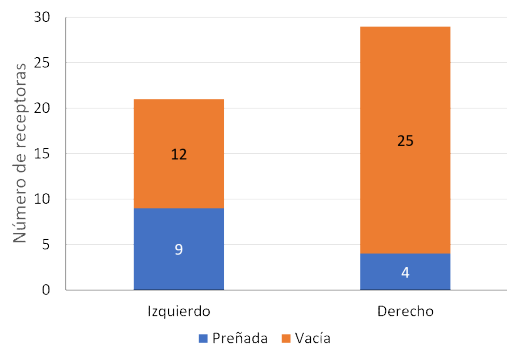


Figura 3. Efecto de la ubicación del cuerpo lúteo en el ovario derecho o izquierdo sobre la tasa de gestación con embriones frescos procedentes de producción *in vitro*

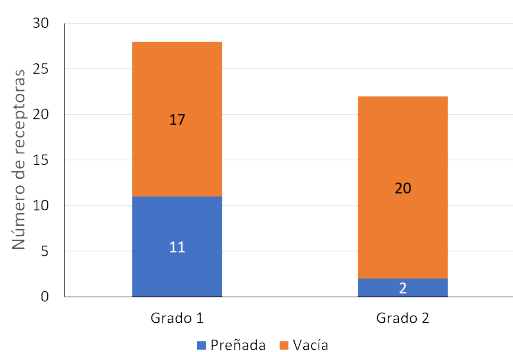


Figura 4. Efecto de la calidad del embrión (G1 y G2) sobre la tasa de gestación con embriones frescos procedentes de producción *in vitro*

hembras con CC baja (<2.5) presentan una alta incidencia de regresión del CL con la consiguiente pérdida de la gestación. Las vacas con mayor tamaño de CL tuvieron una mayor tasa de preñez. Se sabe que existe una relación directa entre el diámetro del CL con la producción de progesterona, hormona encargada del mantenimiento de la gestación (Filho *et al.*, 2010; Rigoglio *et al.*, 2013). Además, un CL de mayor diámetro presenta una mayor vascularización, lo cual favorece una mayor funcionalidad (Pinaffi *et al.*, 2015). De otra parte, la mayor tasa de preñez en hembras jóvenes (nulíparas y primíparas) con relación a vacas multíparas observada en el presente estudio también ha sido reportado

por Ferraz *et al.* (2016). Posiblemente debido a la concentración local de ciertos metabolitos, que a su vez reducen la síntesis de estradiol y progesterona (Stangaferro *et al.*, 2018; Schuermann *et al.*, 2019).

Factores Cualitativos en la Preñez

Cuerno uterino

La deposición del embrión se realizó en el cuerno uterino ipsilateral al ovario que presentaba el cuerpo lúteo. Los resultados indican una frecuencia de preñez de 4/29 y de 9/21 cuando las transferencias fueron realizadas en los cuernos derecho e izquierdo, respectivamente ($p=0.0275$). En este sentido, Alkan *et al.* (2020) reportaron un ligero incremento de la preñez cuando el embrión fue transferido cuando el CL estaba presente en el lado izquierdo (42.2% vs. 37%) utilizando embriones producidos *in vivo*.

Calidad de embrión

Se obtuvo una frecuencia de preñez de 11/28 y de 2/22 cuando las transferencias fueron realizadas con embriones Grado 1 y Grado 2, respectivamente ($p=0.01568$). El 39.3% de preñez logrado con embriones de grado 1 demuestra la mayor capacidad de sobrevivir que aquellos de grado 2, posiblemente debido a una mayor producción de interferón tau que es requerida para el reconocimiento de preñez continuando su desa-

Cuadro 2. Factores cuantitativos y cualitativos en conjunto que intervienen en la preñez de embriones procedentes de FIV

	Estimado	Error estándar	Valor de z	p valor
Intercepto	0.643	3.5283	0.182	0.855
Calidad de embrión	1.8061	1.2129	1.489	0.136
Condición corporal	-0.6002	1.2794	-0.469	0.639
Diámetro de cuerpo lúteo	17.0283	2243.3558	0.008	0.994
Lado del ovario	-1.1711	1.0245	-1.143	0.253
Número de partos	0.7522	0.4605	1.634	0.102

rollo embrionario y evitando la liberación de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) que podría generar la luteólisis (Carter *et al.*, 2008; Alkan *et al.*, 2020).

Modelo Lineal Generalizado

El modelo lineal generalizado sobre los factores en conjunto que afectan la preñez de embriones producidos por *in vitro* se muestra en el Cuadro 2. El modelo lineal generalizado permite determinar en conjunto todos los factores que afectan la preñez, pudiendo observarse que ningún factor fue significativo.

En conclusión, los mejores resultados para un programa de transferencia de embriones producidos *in vitro* se podrían obtener con receptoras nulíparas o primíparas que presenten un CL de mayor diámetro, $CC > 2.6$, lugar de transferencia al lado izquierdo y utilizando embriones de grado 1 en receptoras.

LITERATURA CITADA

1. **Al-Katanani YM, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Krininger CE, Block J, Thatcher WW, et al. 2002.** Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified *in vitro* produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology* 58 171-182. doi: 10.1016/S0093-691X(02)00916-0
2. **Alkan H, Karasahin T, Dursun S, Satilmis F, Erdem H, Güler M. 2020.** Evaluation of the factors that affect the pregnancy rates during embryo transfer in beef heifers. *Reprod Domest Anim* 55: 421-428. doi: 10.1111/rda.13623
3. **Block J, Bonilla L, Hansen PJ. 2010.** Efficacy of *in vitro* embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. *J Dairy Sci* 93: 5234-5242. doi: 10.3168/jds.2010-3443
4. **Blondin P. 2017.** Logistics of large scale commercial IVF embryo production. *Reprod Fert Develop* 29: 32-36. doi: 10.1071/RD16317
5. **Bó GA, Mapletoft R. 2018.** Embryo transfer technology in Cattle. In: Niemann C, Wrenzycki H (eds). *Animal biotechnology*. Springer. p 107-133).
6. **Carter FA, Forde NA, Duffy PA, Wade MA, Fair TA, Crowe MAA, Evans ACOA, et al. 2008.** Effect of increasing progesterone concentration from day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod Fert Develop* 20: 368-375. doi: 10.1071/rd07204
7. **Colazo MG, Mapletoft R. 2007.** Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. *Cienc Vet* 9: 20-37.
8. **Drost M, Ambrose JD, Thatcher MJ, Cantrell CK, Wolfsdorf KE, Hasler JF, Thatcher W. 1999.** Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology* 52: 1161-1167. doi: 10.1016/S0093-691X-(99)00208-3
9. **Ferraz PA, Burnley C, Karanja J, Vieira-Neto A, Santos JEP, Chebel RC, Galvão KN. 2016.** Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. *Theriogenology* 86: 1834-1841. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.032
10. **Filho MFS, Crespilho AM, Santos JEP, Perry GA, Baruselli PS. 2010.** Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim Reprod Sci* 120: 23-30. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.03.007

11. **Gonella AM, Holguín G, Montaña D, Valbuena D. 2013.** Corpus luteum diameter and embryo developmental stage are associated with pregnancy rate: data analysis from 17, 521 embryo transfers from a commercial *in vitro* bovine embryo production program. *Anim Reprod Sci* 10: 106-111.
12. **Gümen A, Guenther JN, Wiltbank MC. 2003.** Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 86: 3184-3194. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73921-6
13. **Hasler JF. 2001.** Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56: 1401-1415. doi: 10.1016/S0093-691X-(01)00643-4
14. **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. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.010
15. **Ideta A, Aoyagi Y, Tsuchiya K, Kamijima T, Nishimiya Y, Tsuda S. 2013.** A simple medium enables bovine embryos to be held for seven days at 4 °C. *Sci Rep* 3: 1173. doi: 10.1038/srep01173
16. **Lamb GC, Mercadante VRG. 2014.** Selection and management of the embryo recipient herd for embryo transfer. In: *Bovine reproduction*. John Wiley. p 723-732.
17. **Palma G. 2008a.** Evaluación morfológica de los embriones bovinos. In: *Biotecnología de la reproducción*. Mar del Plata, Argentina: Ed. ReproBiotec. p 237-247.
18. **Palma G. 2008b.** Transferencia de embriones bovinos y comunicación embriomaternal. En: *Biotecnología de la reproducción*. Mar del Plata, Argentina: Ed. ReproBiotec. p 251-268.
19. **Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Cister ES, Eyestone WH. 1986.** Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25: 951-600. doi: 10.1016/0093-691x(86)90143-
20. **Peixoto MGCD, Bergmann JAG, Suyama E, Carvalho MRS, Penna VM. 2007.** Logistic regression analysis of pregnancy rate following transfer of *Bos indicus* embryos into *Bos indicus* x *Bos taurus* heifers. *Theriogenology* 67: 287-292. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.06.012
21. **Pérez-Mora A, Segura-Correa J, Peralta-Torres J. 2020.** Factors associated with pregnancy rate in fixed-time embryo transfer in cattle under humid-tropical conditions of Mexico. *Anim Reprod* 17: 1-9. doi: 10.1590/1984-3143-AR2020-0007
22. **Pérez MG, Quispe B, Pérez U. 2019.** Producción de embriones *in vitro* en una incubadora portátil de dióxido de carbono y viabilidad *in vivo* post transferencia a vacas receptoras. *Rev Invest Altoandinas* 21: 249-256. doi: 10.18271/ria.2019.501
23. **Pérez GU, Gonzáles GE, Huayta AR, Apaza TM, Quispe BY, Pérez DM. 2019.** Factores que afectan la transferencia de embriones de alpacas (*Vicugna pacos*) a llamas (*Lama glama*). *Rev Inv Vet Peru* 30: 1645-1652. doi: 10.15381/rivep.v20i4.17276
24. **Pinaffi FLV, Santos ÉS, da Silva MG, Filho MM, Madureira EH, Silva LA. 2015.** Follicle and corpus luteum size and vascularity as predictors of fertility at the time of artificial insemination and embryo transfer in beef cattle. *Pesqui Vet Brasil* 35: 470-476. doi: 10.1590/S0100-736X2015000500015
25. **Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR. 2010.** Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and indicus-taurus dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* 74: 1349-1355. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.004

26. **R Core Team. 2020.** R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. [Internet]. Available in: <https://www.r-project.org/>
27. **Rigoglio NN, Fátima LA, Hanassaka JY, Pinto GL, Machado ASD, Gimenés LU, Baruselli PS, et al. 2013.** Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. *Theriogenology* 79: 673-679. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.11.023
28. **Schuermann Y, Welsford GE, Nitschmann E, Wykes L. 2019.** Association between pre-breeding metabolic profiles and reproductive performance in heifers and lactating dairy cows. *Theriogenology* 131: 79-88. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.03.018
29. **Singh WL, Sonowal J, Das A, Barua PM, Gogoi C, Mahanta D, Deuri N, Sathapathy S. 2017.** Recovery of bovine oocytes in respect of quality and quantity by using different techniques *J Entomol Zool Stud* 6: 250-253.
30. **Stangafferro ML, Wijma RW, Masello M, Thomas MJ, Giordano JO. 2018.** Extending the duration of the voluntary waiting period from 60 to 88 days in cows that received timed artificial insemination after the double-Ovsynch protocol affected the reproductive performance, herd exit dynamics, and lactation performance of dairy. *J Dairy Sci* 101: 717-735. doi: 10.3168/jds.2017-13046
31. **Suzuki T, Sumantri C, Khan NH, Murakami M, Saha S. 1999.** Development of a simple, portable carbon dioxide incubator for *in vitro* production of bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 54: 149-157. doi: 10.1016/S0378-4320(98)00134-1
32. **Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE. 1972.** Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil* 30: 493-497. doi: 10.1530/jrf.0.0300493
33. **Vajta G, Holm P, Greve T, Callensen H. 1996.** Overall efficiency of *in vitro* embryo production and vitrification in cattle. *Theriogenology* 45: 683-689. doi: 10.1016/0093-691x(95)00414-4
34. **Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. 1997.** The submarine incubation system, a new tool for *in vitro* embryo culture: a technique report. *Theriogenology* 48: 1379-1385. doi: 10.1016/S0093-691X-(97)00379-8
35. **Vaughan J, Mihm M, Wittek T. 2013.** Factors influencing embryo transfer success in alpacas. A retrospective study. *Anim Reprod Sci* 136: 194-204. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.10.010
36. **Viana J. 2018.** Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter-IETS* 36(4).