

**FACTORES QUE AFECTAN LA TASA DE PREÑEZ EN PROGRAMAS DE
TRANSFERENCIA DE EMBRIONES PRODUCIDOS *IN-VITRO*, EN RAZAS
CEBUINAS**

LINO ANDRÉS OYUELA

**UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
MAESTRIA EN SALUD ANIMAL**

Bogotá D.C.

2009

**FACTORES QUE AFECTAN LA TASA DE PREÑEZ EN PROGRAMAS DE
TRANSFERENCIA DE EMBRIONES PRODUCIDOS *IN-VITRO*, EN RAZAS
CEBUINAS**

LINO ANDRÉS OYUELA

Tesis para optar al título de Magíster en Salud Animal

Director:

Dra. Claudia Jiménez DMV MSc DVSc DACT

Co Director:

Dr. Julio Olaya O. DMV

**UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNICA
MAESTRIA EN SALUD ANIMAL**

Bogotá D.C.

2009

DECLARATORIA DE ORIGINALIDAD Y RECONOCIMIENTO

Declaro que el contenido del presente documento es resultado de mi investigación exclusiva ya que su formulación conceptual, procedimientos de investigación, resultados y conclusiones fueron realizados por mi, Lino Andrés Oyuela.

Esta investigación contó con la valiosa colaboración del personal profesional de Embriogen S.A., además de los valiosos aportes del Director, Dra Claudia Jiménez Escobar, el Co-Director Julio Cesar Olaya y los Jurados. Todos los datos de otros trabajos están debidamente identificados con su respectiva cita incluidas en las notas bibliográficas

Nota de aceptación

Firma Jurado

Firma Jurado

Firma Jurado

Bogotá Junio. 2009

Agradecimientos:

A todos los que hicieron posible este proyecto, a mi principal patrocinador Eduardo Oyuela, a Embriogen S.A. en cabeza del Dr. Julio Olaya DMV, por su valiosa colaboración con los datos que permitieron el desarrollo del proyecto y a mi Directora, Dra. Claudia Jiménez, DVM, MSc, DVSc, DACT.

A mi familia

A Dios.

ÍNDICE GENERAL

	Pág
INTRODUCCION	3
1. OBJETIVOS	5
1.1 OBJETIVO GENERAL	5
2. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	6
2.1 PRODUCCION DE EMBRIONES	7
2.1.1 Superovulación	8
2.1.2 Producción <i>in-vitro</i> de embriones (PIV)	8
3. FACTORES QUE AFECTAN LA PREÑEZ EN PROGRAMAS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES	9
3.1 FACTORES EXTRÍNSECOS	10
3.1.1 Ambientales	11
3.1.2 Manejo	12
3.1.3 Nutricionales	13
3.2 FACTORES INTRINSECOS	14
3.2.1 Calidad del cuerpo lúteo	14
3.2.2 Factores asociados al embrión	16
3.2.2.1 Calidad del embrión	17
3.2.2.2 Estado de desarrollo	18
3.2.2.3 Toros	20
3.2.3 Factores asociados al manejo del embrión post producción	21
3.2.3.1 Tiempo transcurrido entre entrega y la transferencia	21
3.2.3.2 Orden consecutivo de la transferencia de los embriones	21
3.2.3.3 Dificultad el momento de la transferencia	22
4. MATERIALES Y METODOS	23
4.1 MARCO GEOGRAFICO	23

4.2 METODOLOGIA	24
4.2.1 Selección y Sincronización de las receptoras	24
4.2.2 Producción de embriones <i>in-vitro</i> (PIV)	24
4.2.2.1 Aspiración folicular	25
4.2.2.2 Maduración <i>In-Vitro</i> (MIV)	25
4.2.2.3 Fecundación <i>In-Vitro</i> (FIV)	25
4.2.2.4 Cultivo In-Vitro (CIV)	25
4.2.3 Diagnóstico de preñez	26
4.2.4 Pérdidas tempranas de gestación	26
4.3 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES	26
4.3.1 Selección y clasificación de los embriones	27
4.3.1.1 Calidad del embrión	27
4.3.1.2 Estado de desarrollo del embrión	28
4.3.2 Criterios de selección de las receptoras el día de la transferencia	28
4.3.2.1 Tamaño del Cuerpo Lúteo al momento de la transferencia	28
4.3.2.2 Condición corporal	28
4.3.2.3 Temperamento de la receptora	29
4.3.2.4 Categoría de la Receptora	29
4.3.2.5 Dificultad en la Transferencia	29
4.3.2.6 Número de transferencias consecutivas antes de quedar preñada	29
4.3.2.7 La evaluación de las pérdidas tempranas de la gestación	30
4.3.3 Variables administrativas asociadas a la técnica de Transferencia de Embriones de PIV	30
4.3.3.1 Tiempo transcurrido entre la entrega de los embriones en el laboratorio en Bogotá y la transferencia en cada receptora	30
4.3.3.2 Cantidad de embriones transferidos de forma consecutiva	30
4.3.3.3 Lado del útero donde se transfiere el embrión	31
4.3.3.4 Experiencia del técnico	31
4.3.3.5 Técnico	31
4.3.3.6 Grupo racial de los embriones	31
4.3.3.7 Toros	32
4.3.3.8 Época del año	32
4.3.3.9 Central de receptoras donde se transfirió el embrión	32
4.3.3.10 Origen del semen utilizado en la PIV	33

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
6. RESULTADOS	36
6.1 VARIABLES ASOCIADAS A LA RECEPTORA	36
6.2 VARIABLES ASOCIADAS AL EMBRIÓN	37
6.3 VARIABLES ASOCIADAS AL TÉCNICO QUE TRANSFIERE LOS EMBRIONES.	38
6.4 VARIABLES ASOCIADAS AL MANEJO DEL EMBRIÓN POST PRODUCCIÓN EN EL LABORATORIO.	39
6.5 MODELO ESTADÍSTICO	40
6.6 PÉRDIDAS TEMPRANAS DE LA GESTACIÓN.	42
7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	43
7.1 VARIABLES ASOCIADAS A LA TASA DE PREÑEZ	43
7.1.1 Dificultad al momento de la transferencia	43
7.1.2 Calidad del embrión transferido	43
7.1.3 Tiempo transcurrido entre la salida de los embriones de laboratorio y la transferencia	44
7.2 VARIABLES NO ASOCIADAS A LA TASA DE PREÑEZ	45
7.2.1 Variables relacionadas a la receptora	45
7.2.2 Variables relacionadas al embrión	47
7.2.3 Variables relacionadas al técnico que transfiere los embriones	49
7.2.4 Variables relacionadas al manejo post producción de los embriones	51
7.3 PERDIDAS TEMPRANAS DE GESTACIÓN	54
8. CONCLUSIONES	56
9. RECOMENDACIONES	58
BIBLIOGRAFIA	61
ANEXOS	69

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Tasa de preñez para las variables asociadas a la receptora	37
Tabla 2. Tasa de preñez para las variables asociadas al embrión transferido	38
Tabla 3. Tasa de preñez para las variables asociadas al técnico que transfiere el embrión	39
Tabla 4. Tasa de preñez para las variables asociadas al manejo del embrión post producción y de acuerdo a la época del año en que se produjo	40
Tabla 5. Análisis univariado para los factores asociados con las tasas de Preñez en programas de transferencia de embriones producidos <i>in vitro</i> en razas cebuínas	41
Tabla 6. Modelo de regresión logística binomial para los factores asociados con las tasas de preñez en programas de transferencia de embriones producidos <i>in vitro</i> en razas cebuínas.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Análisis de los resultados de programas de inseminación artificial y transferencia de embriones comparando tres diferentes fincas.	13
Figura 2. Estadios de desarrollo del embrión de acuerdo al día del ciclo (IETS, 2000).	18
Figura 3. Esquema de sincronización de receptoras con Crestar®, hasta el día de la transferencia.	24
Figura 4. Tasa de preñez respecto al tiempo transcurrido entre la entrega de los embriones en el laboratorio y la transferencia del embrión.	45
Figura 5: Porcentaje de preñez por tamaño de cuerpo lúteo, al momento de la transferencia del embrión.	46
Figura 6. Porcentaje de preñez de acuerdo a la cantidad de transferencias consecutivas a una misma receptora antes que quedar preñada	47
Figura 7. Tasa de preñez de acuerdo al desarrollo del embrión transferido.	48
Figura 8. Tasa de preñez por Toro usado en la PIV	49
Figura 9. Tasa de preñez, por grupos de 10 embriones transferidos consecutivamente por el mismo técnico.	50
Figura 10. Distribución de las tasa de preñez, por mes, en un año.	51
Figura 11. Pluviosidad en las diferentes regiones donde se encuentran ubicadas las centrales de receptoras, variación mensual en el año.	52

Figura 12. Promedios mensuales de horas de luz diaria a lo largo del año, para una ubicación en el centro Colombia (8,0N 74,0W). 53

Figura 13. Tasa de preñez mensual comparado con el promedio mensual de duración de los días para una locación en 8,0N 74,0W. 54

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág
Anexo A. Formulario de recolección de datos producto del estudio	69
Anexo B. Análisis estadístico univariado	70
Anexo C. Regresión logística	91

RESUMEN

Existen gran variedad de factores que afectan las tasas de preñez en programas de transferencia de embriones producidos *in-vitro*. con el objeto de aumentar la eficiencia de estos programas, se evaluaron los factores relacionados con la receptora, el embrión, el técnico que transfiere los embriones y los factores administrativos inherentes al desarrollo comercial de la técnica.

Se recopilaron los datos de tres centrales de receptoras durante un año, se analizaron en total 1227 embriones transferidos de tres grupos raciales diferentes Brahman Gris, Brahman Rojo y Gyr. La tasa de preñez total fue de 38% (462/1227). El modelo estadístico usado fué una Regresión Logística para evaluar el grado de asociación entre las variables incluidas en el modelo final con las tasas de preñez. La fortaleza de la asociación fue calculada a través del Odds Ratio (OR) con sus correspondientes intervalos de confianza del 95%.

Se encontró que la tasa de preñez es afectada por la calidad del embrión ($p=0,01$); un embrión de calidad excelente tiene 2,4 veces más posibilidades de producir una preñez comparado con los embriones de calidad Bueno ($OR= 2,4$); la dificultad de la transferencia ($p<0,05$), un embrión transferido sin dificultad tiene 5 veces mas posibilidades de producir una preñez comparado con los embriones transferidos con alguna dificultad ($OR= 5$); el tiempo de la transferencia ($p<0,05$), un embrión transferido dentro de las primeras 5 horas después de ser entregado en el laboratorio tiene 1,4 veces mas posibilidades de producir una preñez comparado con los que fueron transferidos después de las 5 horas ($OR= 1,4$).

ABSTRACT

There is a great variety of factors that affect the pregnancy rates in *in-vitro* produced embryo transfer programs; with the intention of increasing the efficiency of these programs; related factors were evaluated: the recipient, the embryo, the technician who transfers the embryos and management factors inherent to the commercial development of the technique.

The data of three recipient stations were compiled during a year, altogether analyzed 1227 transferred embryos of three different racial groups: Gray Brahman, Red Brahman and Gyr. The pregnancy rate was of 38% (462/1227). The used statistical model was Logistic Regression to evaluate the degree of association between the variables with the pregnancy rate. The strength of the association was calculated through Odds Ratio (OR) with its corresponding intervals of confidence of 95%.

Finding that the pregnancy rate affected by; The quality of the embryo ($p=0,01$), an embryo of excellent quality has 2.4 times more possibilities of producing a pregnancy compared with the embryos of Good quality (OR= 2.4). The difficulty of the transference ($p< 0.05$), an embryo transferred without difficulty has 5 times more possibilities of producing a pregnancy compared with the embryos transferred with some difficulty (OR= 5) and the time of the transfer ($p< 0.05$), an embryo transferred within the first 5 hours after being given in the laboratory has 1.4 times but possibilities of producing a pregnancy compared with the ones that were transferred after the 5 hours (OR= 1.4).

INTRODUCCIÓN

Las biotecnologías reproductivas han tenido un gran impacto en la zootecnia, desde sus inicios con la Inseminación Artificial (I.A.), que en los años 40 revolucionó la ganadería y fue la primera de una serie de avances en mejoramiento genético en la producción de ganado bovino en principio y aplicado a muchas áreas de la zootecnia posteriormente. Thibier (2005b) divide la historia de las biotecnologías reproductivas en cuatro generaciones, siendo la producción de embriones PIV de las últimas después de la inseminación artificial y la transferencia de embriones.

La producción de embriones *in-vitro* (PIV) en la ganadería bovina ha venido tomando alta relevancia dentro de las biotecnologías en el mundo. El número total de embriones transferidos por esta técnica muestra un aumento significativo en los últimos nueve años (Thibier, 2002; 2003; 2004; 2005; 2006). Es por esto que adquieren alta importancia los estudios que busquen hacer más eficiente la técnica.

En Colombia se ha observado una misma tendencia, de lo que se observa a nivel mundial. Según datos de Asocebú (2008) se nota un aumento en los trabajos de PIV (+47%), lo que contrasta con un descenso de los de TE convencional (-11%).

En Colombia La transferencia de embriones (TE), como herramienta de mejoramiento, se ha utilizado durante los últimos 20 años con embriones producidos por superovulación (convencional) y desde hace 10 años con embriones producidos por técnicas de producción *in-vitro* (PIV). Posicionando al país como productor de ganados elite especialmente de la raza Brahman, gran parte de este desarrollo fue debido a la aceleración en mejoramiento genético dado por las biotecnologías de TE ampliamente usadas en la actualidad.

La amplia bibliografía actual especializada en reproducción confirma que la TE de embriones por PIV avanza a un ritmo acelerado, mientras la TE convencional esta en declive por lo que en un futuro cercano se puede convertir en la técnica preferida por los ganaderos para sus programas de mejoramiento genético.

Estudiar los factores que afectan la preñez en programas comerciales de TE de embriones de PIV resulta en sugerencias prácticas que podrían hacer eficiente esta biotecnología y por ende el desafío de popularizar la técnica y hacerla asequible a los pequeños y medianos ganaderos será mucho menor.

La eficiencia en la transferencia de embriones (TE) está dada por el costo de producir una cría viva. Por consiguiente el presente estudio analizó los diferentes factores que afectan las tasas de preñez y la eficiencia de los programas de TE. Debido a que el estudio se realizó dentro del marco comercial se discutieron también estos factores y su posible incidencia en la eficiencia y en la aplicación de la técnica.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar algunos factores que pueden influir sobre la tasa de preñez al día 60, en programas comerciales de transferencia de embriones producidos *in vitro* en ganado Cebú.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar algunas variables asociadas a la receptora en el momento de la transferencia del embrión que pueden afectar las tasas de preñez, tales como: la calidad del cuerpo lúteo, condición corporal, temperamento, y estatus reproductivo (vaca o novilla).
- Evaluación de otros factores que pueden afectar las tasas de preñez al momento de la transferencia como: calidad y estado de desarrollo del embrión, dificultad en la transferencia, y número de transferencias previas (repeticiones de TE a una receptora antes que quedar preñada).
- Estimar el porcentaje de pérdidas tempranas de la gestación en las receptoras entre el día 35 al 90 de preñez.
- Evaluar el efecto del tiempo transcurrido entre la salida del embrión del laboratorio y el momento de la transferencia.

2. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

La Transferencia de Embriones (TE) hace parte de las biotecnologías aplicadas en ganadería que buscan el mejoramiento genético. La historia de las biotecnologías de la reproducción se remonta a los años 40 cuando se empieza a la inseminación artificial comercialmente en ganaderías bovinas. Thibier (2005b) divide la historia de las biotecnologías reproductivas en 4 generaciones:

1. Primera Generación
 - Inseminación artificial (desde 1945).
2. Segunda Generación
 - Transferencia de embriones convencional (desde 1975) .
3. Tercera Generación
 - Sexaje de embriones (desde 1990).
 - Producción de embriones *In-vitro* (PIV) (desde 1992).
 - Clonaje (desde 1995).
4. Cuarta Generación
 - Transgénicos (200?)

A nivel mundial, en la ganadería bovina la producción de embriones *in-vitro* (PIV) ha venido tomando alta relevancia dentro de las biotecnologías reproductivas. Reflejado esto en el total de embriones transferidos por esta técnica ha tenido un aumento significativo según los datos recopilados por la Sociedad Internacional de Transferencia de embriones (IETS) a nivel mundial, que muestra un aumento de más de 10 veces en la cantidad de embriones PIV transferidos en un lapso de 5 años:

- 2001: 15.371 embriones PIV transferidos, (Thibier, 2002).
- 2002: 66.051 embriones PIV transferidos (+329%), (Thibier, 2003).
- 2003: 91.372 embriones PIV transferidos (+38%), (Thibier, 2004).
- 2004: 128.951 embriones PIV transferidos (+41%), (Thibier, 2005a).
- 2005: 183.477 embriones PIV transferidos (+42%), (Thibier, 2006).

En Colombia se ha observado la misma tendencia que ocurre a nivel mundial. La Asociación de Criadores de Ganado Cebú - Asocebú (2008) reporta los siguientes datos de animales registrados en el año 2007 y en un lapso comprendido ente el 01 de enero y el 15 de diciembre del año 2008:

- 2007: 2638 animales registrados de PIV versus 5165 obtenidos por transferencia convencional
- 2008: 3887 animales registrados de PIV (+ 47%) versus 4577 obtenidos por transferencia convencional (-11%)

Se observa un aumento significativo de los animales por PIV y una disminución de los registrados por TE convencional. Cabe anotar que si bien los porcentajes de preñez son un poco menores en PIV comparado con la transferencia de embriones convencional (33% Vs 41%), la capacidad de producir preñeces por unidad de tiempo es mayor en PIV. Mientras que a un mismo animal por mes se puede realizar máximo una transferencia convencional, en el mismo lapso de tiempo se hacen dos rutinas de PIV, esta ventaja parece ser la principal causa de que los ganaderos comiencen a migrar de hacia PIV (Pontes, 2009).

En los programas de PIV, una vaca donadora es seleccionada por sus cualidades genéticas superiores demostradas por su fenotipo y sus características productivas. Al mismo tiempo se preparan las receptoras que son hembras seleccionadas previamente y que son sincronizadas para que su ciclo hormonal coincida en días con la edad del embrión que se le transferirá; esto quiere decir, que tanto la receptora como el embrión se deben encontrar alrededor del día 7 de desarrollo (embrión) y día 7 del ciclo (receptora) (Palma, 2001).

2.1 PRODUCCION DE EMBRIONES

En la actualidad se disponen de dos formas de obtención de embriones en los programas comerciales de TE: superovulación e inseminación de donadoras y producción de embriones *in-vitro* a partir de oocitos obtenidos *post-mortem* o *in-vivo* (PIV).

2.1.1 Superovulación. Fisiológicamente la vaca es un animal monotoco, por lo que es necesario usar estrategias hormonales para inducir ovulación múltiple. Siete días después de inseminadas las vacas superovuladas, se retiran los embriones mediante lavado uterino transcervical (Callesen et al., 1995; Crosier et al., 2001). Para el proceso de superovulación se usa la hormona folículo estimulante (FSH) realizando aplicaciones intramusculares generalmente cada 12 horas durante 4 días consecutivos, en dosis decrecientes (García-Bojalil et al., 1988; Malghi et al., 2007; Ideta et al., 2007; Rico, 2008)

2.1.2 Producción *in-vitro* de embriones (PIV). La PIV es un procedimiento que se desarrolla en 4 diferentes procesos, el primero de ellos se conoce como “ovum pick up” (OPU), término de habla inglesa usado comúnmente para aspiración folicular. Este proceso es seguido de maduración *in-vitro* (MIV), fertilización *in-vitro* (FIV) y cultivo *in-vitro* (CIV) Revisado en detalle por Palma (2001).

La obtención de los oocitos se hace mediante punción folicular directamente de los ovarios *in-vivo* o directamente de los ovarios post-mortem, aspirando los folículos antrales presentes en la corteza ovárica. Los oocitos cubiertos por células del *cumulus* denominados como complejo *cumulus* oocito (COC's, siglas en inglés). Son clasificados según su calidad y llevados al primero de los procesos, la MIV; los COC's son incubados por aproximadamente 24 horas en un ambiente controlado de humedad, temperatura y CO₂. Durante esta etapa sufre un proceso de maduración nuclear y citoplasmática, saliendo de su fase de arresto meiotico en profase I y quedando apto para ser fecundado (Crosier et al., 2001; Knijn et al., 2002; Lazzari et al., 2002).

El paso siguiente es la FIV, en el cual después de procesar el semen para separar los espermatozoides vivos mediante centrifugación en gradiente de Percoll[®], se añaden al medio de fertilización con los COC's donde estarán entre 6 y 20 horas. Posteriormente se retiran los detritos de *cumulus* y los oocitos ya fecundados se depositan en medio de cultivo. Dependiendo del protocolo, se realizan controles como lectura de clivaje y cambios de medio. Los embriones son evaluados 7 días después de la fertilización finalizando así el proceso de PIV, (Callesen et al., 1995; Brackett y Oliphant, 1975; Rizos et al., 2002; Freret et al., 2006).

3. FACTORES QUE AFECTAN LA PREÑEZ EN PROGRAMAS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

Mundialmente se acepta que en programas de transferencia de embriones se puede obtener un 50% de preñez promedio de trabajos realizados con técnicas similares (Peterson et al, 2003). Distintos autores reportan resultados similares en diferentes países, tanto para embriones obtenidos por TE convencional como para los embriones PIV. Hasler (2001) en su estudio reporta datos de 20 años de TE convencional en Holstein para Norte América donde para un total de 14.699 transferencias en diferentes locaciones y a largo de diferentes años (1987, 88, 91 y 92) se han obtenido tasas de preñez que varían entre 40 y 70%.

Thibier (2005b) reporta datos del laboratorio de la unión Nacional de Cooperativas de Inseminación artificial en Francia (UNCEIA; París, Francia) quienes en su programa comercial de TE de embriones PIV reportan 46.3% de preñez al día 90. Para este autor los resultados de TE convencional y PIV son similares, existiendo una tendencia a ser menores en PIV.

Esta información concuerda con los datos obtenidos por Franco *et.al.* (2006b) quienes en su trabajo buscaron encontrar si existían diferencias entre la tasa de preñez de receptoras transferidas con uno o con dos embriones de PIV de raza Holstein, además evaluó las diferencias entre vacas y novillas. Encontraron que no existe diferencia ($p=0,07$) en la tasas de preñez de vacas transferidas con uno 57% (8/14) o con dos embriones 50% (6/12) y en novillas la tendencia fue más marcada: 41% (7/17) para las transferidas con un embrión Vs 20% (3/15) para las transferidas con dos embriones. Estos resultados arrojan una preñez total de las transferidas con un solo embrión de 48.3% (15/31) para el día 64 de gestación, siendo este dato acorde con Thiber (2005b).

Lonergan *et.al.* (1999) en su estudio de embriones PIV de oocitos obtenidos de ovarios de matadero, cuando compararon los tiempos al primer clivaje contra tasa de preñez y proporción hembra/macho encontraron que no existía diferencia ($p>0,05$) para las estructuras con clivaje a las 30 horas comparado con los clivados a las 36 horas tanto para proporción hembra/macho como para la tasa de preñez, para este último los

datos fueron: preñez total 43% (46/107); sin diferencia entre grupos ($p>0,05$); 45% (25/55) contra 40% (21/52) para los cigotos clivados a las 30 horas post fertilización y a las 36h respectivamente.

Siendo estos resultados de preñez total comparables con los obtenidos por Franco (2006b), y con los de Thibier (2005b) por lo que se puede concluir que la tasa de preñez de trabajos de TE de embriones PIV puede variar entre 43 y 46%, que es una técnica usada no solo para producir embriones bovinos para estudios científicos de la dinámica embrionaria temprana en mamíferos sino que esta siendo ampliamente usada en el mundo a nivel comercial para producir crías de animales deseables genéticamente

Los factores que afectan los índices reproductivos del ganado bovino (preñez, días abiertos, etc.) han demostrado también que pueden afectar los índices de preñez en las biotecnologías reproductivas como la Inseminación artificial (Franco *et.al.*, 2006a), la TE convencional (Kafi *et.al.*, 1997) y la PIV (Block y Hansen, 2007). Es por esto que en la revisión se encontrará citados trabajos de diferentes biotecnologías y los posibles factores que afectan sus resultados

A continuación se describen los factores que podrían en mayor medida afectar los resultados de la preñez en un programa de transferencia de embriones. Kafi *et al.*, (1997) hacen una clasificación de estos factores en intrínsecos y extrínsecos. A pesar que su revisión refiere a factores que afectan la respuesta superovulatoria en las vacas, estos factores también afectan los índices reproductivos, por lo tanto la forma usada por el autor para agrupar los factores se usará en este trabajo para los factores que afectan la tasa de preñez en receptoras.

3.1 FACTORES EXTRÍNSECOS

Estos son los factores que se encuentran relacionados con la ecología que rodea al animal. Incluye factores que afecten de alguna manera el desempeño y/o el bienestar, ejerciendo diferentes tipos de presión que modifica la fisiología del individuo.

3.1.1 Ambientales. El medio ambiente como elemento constante en todo tipo de producción pecuaria ejerce influencias positivas y negativas sobre los organismos. Esto se ve muy claramente en los animales de zonas sub-tropicales, que tiene un ciclo reproductivo activo solo durante una época del año. Los factores ambientales pueden afectar los porcentajes de preñez en la fincas y dentro de éstos, el estrés calórico ha sido de los factores que más se ha estudiado. Franco *et al.* (2006a) 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). 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 (2001), en un estudio sobre los factores que afectan la preñez en transferencia de embriones 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% ($n=2394$)

En el trópico debido a la ausencia de estaciones marcadas se han realizado estudios dependiendo de si se está en época seca o en época de lluvias. Díaz y García (1999) evaluaron el efecto de la pluviosidad sobre los porcentajes de preñez en programas de transferencia de embriones en razas cebuínas en el trópico bajo colombiano, encontrando que no había relación entre la pluviosidad mensual y la tasa de preñez.

Block y Hansen (2007) en su estudio con embriones de PIV analizaron el efecto del uso del factor asociado a la insulina tipo 1 IGF-1 adicionado al medio de cultivo . Al momento de analizar los datos los separaron por temporadas de calor y frío. Encontrando diferencias estadísticas ($p<0,05$) para el grupo experimental entre temporadas: 26,2%^a (11/42 IGF-1) en la temporada fría Vs 41,8%^b (28/67 IGF-1) en la temporada calida., sin encontrar diferencias entre temporadas del grupo control 24,4% (11/45 control) en la temporada fría Vs 18,3% (13/71 control) en la temporada calida. Esto sugiere que el efecto del IGF-1 fue sobre los embriones PIV bajo estrés calórico mejorando la sobrevivencia post transferencia.

Del artículo anterior se puede especular que podría existir un efecto entre temporadas cálidas comparadas con las temporadas frías por estrés térmico de los embriones en programas de transferencia de embriones PIV, que no fue detectado por el modelo estadístico usado probablemente por la cantidad de datos analizados. Queda la interrogante: Qué hubiera pasado si se hubieran analizado 1000 transferencias?

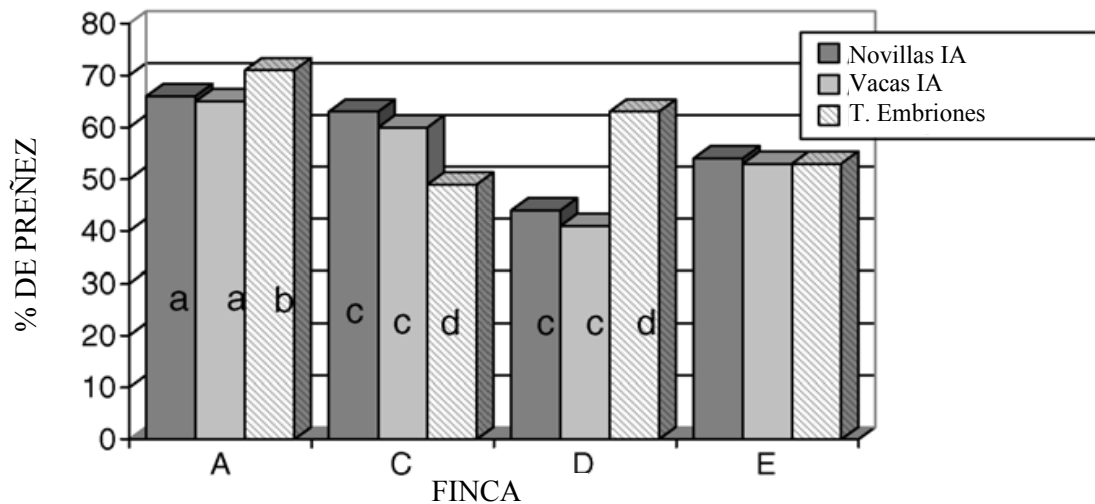
Chebel *et.al.* (2008) en otro estudio que usó embriones producidos por PIV y por superovulación analizaron el efecto de la estación sobre las tasas de preñez, entre otros factores, encontrando que existen diferencias ($p < 0,05$) entre las tasas de preñez de novillas transferidas en verano (52%, 120/231) comparado con las novillas transferidas en invierno (55,8%, 531/952). De manera opuesta, cuando se analizaron los datos de las vacas transferidas encontraron que no existía diferencia entre estaciones ($p > 0,05$) además es ligeramente superior el porcentaje registrado en los meses de invierno: verano 82.5% (189/229), invierno 83,5% (116/139). Los autores explican estos resultados como la expresión de una posible mejor adaptación al medio ambiente de los animales de mayor edad (vacas) que en teoría podrían enfrentar las condiciones de estrés climático de mejor manera que los animales jóvenes

Parece que las estaciones o las diferentes épocas del año podría afectar los resultados en trabajos de Inseminación artificial, pero aparentemente no afectaría 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 grupos son los últimos en verse afectados en las crisis alimentarias.

3.1.2 Manejo. En las diferentes explotaciones, es normal que se presenten diferencias administrativas que alteren los resultados de los diferentes programas como por ejemplo el tipo y cantidad de suplementación mineral que se suministra. 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 (Thatcher *et al.*, 2001). Stroud *et al.*, (2006) estudiaron los factores que hacen que en una finca funcione mejor un programa de

TE. Los resultados obtenidos mostraron grandes diferencias entre fincas, aún donde el mismo grupo de técnicos realiza los procedimientos (Figura 1).

Figura 1. Análisis de los resultados de programas de inseminación artificial y transferencia de embriones comparando tres diferentes fincas (adaptada de Stroud et al., 2006).



Nota: Entre fincas los porcentajes difieren significativamente ab $P < 0.025$, cd $P < 0.001$.

Se encuentra que existe un efecto del manejo entre las explotaciones, como las relacionadas a 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 sombra y agua fresca en los potreros.

Todos estos factores juntos ejercen una presión decisiva en los resultados y 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 de entradas al corral posibles para reducir al máximo el estrés causado.

3.1.3 Nutricionales. El balance nutricional (energía, proteína, vitaminas, minerales y agua) deber ser el adecuado y está generalmente medido como condición corporal

(CC). La CC ejerce una influencia marcada sobre las tasas de preñez, siendo mejores las tasas de preñez cuando es intermedia (de 2-3 en la escala de 1 a 5 donde 5 es obeso y 1 es caquéctico; Mapletof, 1986 citado por Stroud y Hasler, 2006). Para estas condiciones corporales se han reportado tasas de preñez entre 53% y 55% siendo significativamente inferiores para las condiciones extremas de 1 y 4 o más (44% y 47 % respectivamente; Looney *et al.* 2006). Hallazgos que concuerdan con los de Flores *et al.*, (2007) quienes al evaluar la ciclicidad por medio de radio telemetría en ganado cruzado con Brahman (1/4 a 3/8 Brahman) de diferentes CC, compararon días abiertos y tasa de presentación de celos post sincronización con implante intravaginal, encontrando unos mejores los índices en los animales con CC moderado; vacas con presencia de celo dentro de los primeros 30 días: 64% para animales de baja CC contra 82% de celos en animales de CC moderada.

Al contrario de lo descrito anteriormente, Al-Katanani *et. al.* (2002) encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las tasas de preñez entre grupos de diferente CC: $\leq 2,5$ y $>2,5$ hallando porcentajes de preñez diferentes entre los grupos: 15,6%^a y 5,5%^b respectivamente. Estos resultados fueron obtenidos en ganado lechero y en producción, y esto puede ser el origen de las diferencia encontrada en esta cita con respecto a las anteriores sin embargo el autor no discute este resultado en especial.

Durante el proceso de selección de los animales que se realiza rutinariamente en los programas de TE de embriones PIV se efectúa una escogencia minuciosa de los animales a trabajar tanto donadoras como receptoras evitando al máximo el uso de animales con CC extremas, gordas o flacas, y llevando un registro de las condiciones de manejo para optimizar cada uno de los procesos.

3.2 FACTORES INTRINSECOS

Se definen aquellos factores propios del animal que afectan la tasa de preñez y están directamente relacionados con la fisiología del animal y/o con el embrión.

3.2.1 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 (Vasconcelos *et al*, 2001).

La evaluación del tamaño del cuerpo lúteo se hace el día de la transferencia del embrión, vía palpación rectal. Siguiendo la clasificación descrita por Zemjanis (1996):

- 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.

La progesterona es secretada por el cuerpo lúteo formado en el ovario donde ocurrió la ovulación que produjo la preñez, ayudando al establecimiento y mantenimiento de esta así como de un parto exitoso (Shah, *et.al.*, 2007) Debido a la importancia del cuerpo lúteo en la preñez, diferentes autores han buscado optimizar este factor ya sea asegurando la formación de éste, buscando un buen tamaño o estimular la formación de varios cuerpos lúteos.

Binelli *et al* (2001) con el objeto de elevar las tasa de concepción usó diferentes estrategias farmacológicas, consistente 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 P₄. 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 post sincronización comparado con el grupo control sin tratamiento.

De manera similar otros autores ha diseñado protocolos que buscan favorecer la formación de uno o más cuerpos lúteos, Baruselli *et al.* (2004) comparó diferentes 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 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 (1,44 eCG Vs 1,25 control) y la concentración plasmática de progesterona (2,69ng/ml eCG Vs 1,96 control) y tuvo la tendencia a incrementar las tasas de preñez.

En otro estudio, Nogueira *et al.* 2004 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 0 UI, 200 UI, 400 UI y 600 UI). A pesar de que se aumentaron las concentraciones plasmáticas de progesterona (3.93ng/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 inclusive se observó una tendencia a la disminución en las tasas de preñez.

Barceló-Fimbres *et al.* (2009) analizaron entre otros factores el cuerpo lúteo encontrando que no hay diferencias en la tasa de preñez ($p>0.10$) cuando se transfieren embriones de PIV en receptoras que al momento de la transferencia tenían cuerpos lúteos sólidos ($n= 47$) versus receptoras con cuerpos lúteos con una cavidad observada a la ultrasonografía ($n= 26$). Encontrando 34% y 46% de preñez respectivamente; esto puede ser debido a 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 haciendo que un mayor porcentaje de receptoras esten aptas para ser transferidas.

3.2.2 Factores asociados al embrión. La observación y clasificación de los embriones a transferir es parte esencial de los trabajos de transferencia de embriones y se realiza con la ayuda de un microscopio estereoscopio que permite la observación de los embriones y facilita su clasificación de acuerdo con su estadio de desarrollo y su calidad. Vale la pena aclarar que tanto lo embriones de 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 de PIV es ligeramente más rápido que el de TE convencional; prueba de esto es que embriones de día 7 de PIV son mayormente blastocitos expandidos mientras que en convencional este mismo día se encuentran mayormente blastocitos tempranos (Palma, 2001)

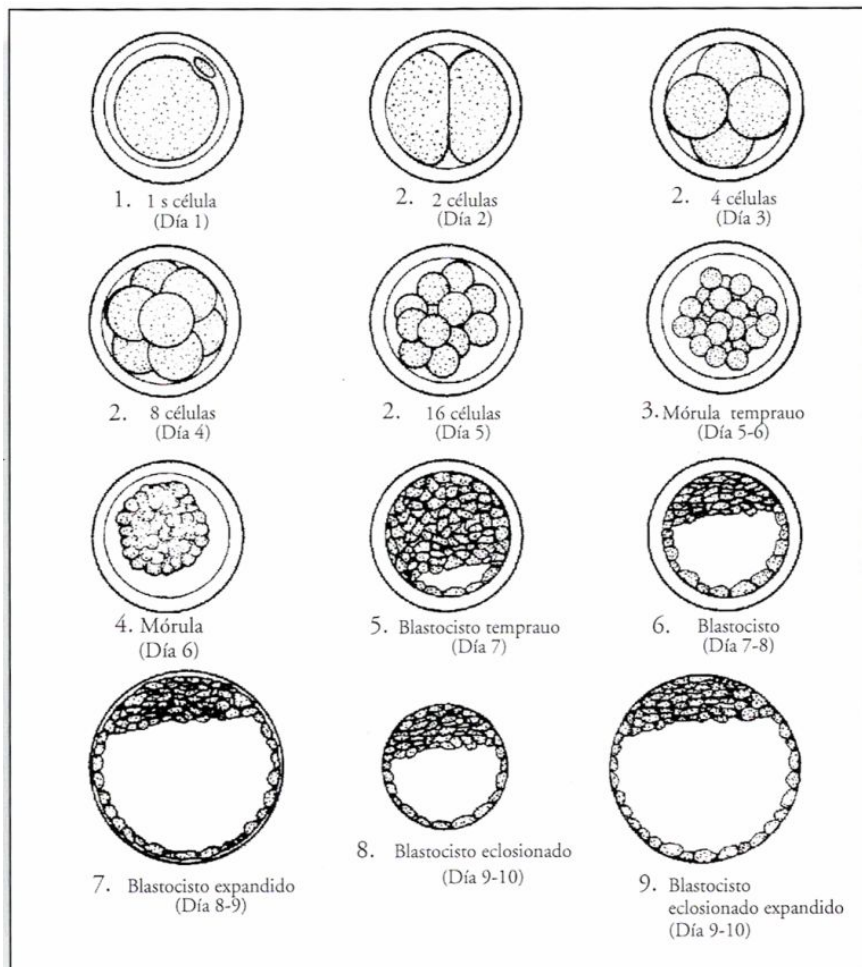
3.2.2.1 Calidad del embrión. La IETS (2000) ha propuesto la siguiente clasificación:

- **Calidad 1:** Excelente o bueno. La masa embrionaria es simétrica y esférica, con blastómeros individuales uniformes en tamaño color y densidad. El desarrollo del embrión es consistente con la fase del desarrollo esperada. Presenta irregularidades relativamente menores y por lo menos el 85% del material debe permanecer intacto dentro de la masa embrionaria. La zona pelúcida debe ser lisa y no debe tener ninguna superficie cóncava o delgada.
- **Calidad 2:** Regular. Presenta irregularidades moderadas en la forma global de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Por lo menos el 50% del material celular debe permanecer intacto dentro de la masa embrionaria.
- **Calidad 3:** Malo. Presenta irregularidades mayores en la forma de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Por lo menos el 25% del material celular debe permanecer intacto dentro de la masa embrionaria.
- **Embriones de calidad 4:** Muertos, degenerados o con retrasos en el desarrollo y óvulos no fertilizados no serán transferidos.

El efecto de la calidad del embrión en las tasas de preñez en programas de TE convencional está muy bien documentado al contrario de los producidos por PIV; Chebel *et al.* (2008) analizando los factores que influyen en la recolección y transferencia de embriones Holstein en TE producto de PIV y de superovulación. El estudio incluyó la calidad del embrión transferido, 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.

3.2.2.2 Estado de desarrollo. A partir de la fecundación, el embrión sufre cambios morfológicos a través del tiempo lo que permite su clasificación por estado de desarrollo. El crecimiento del embrión es en número de células más no en tamaño. Este crecimiento es exponencial y hacia el día seis se denomina mórula por su apariencia semejante a una mora. Aproximadamente el día séptimo empieza a formarse una cavidad denominada blastocele; de este momento en adelante se le denomina blastocito. Para el día noveno ha aumentado su tamaño hasta el punto de romper la zona pelúcida; este evento se le denomina eclosión (King, 1991). Para efectos de estandarizar las clasificaciones, la IETS (2000) asigna un número a cada estadio de acuerdo al día de desarrollo que le corresponde (figura 2).

Figura 2. Estadios de desarrollo del embrión de acuerdo al día del ciclo (IETS, 2000).



Se ha conocido por mucho tiempo que la calidad y desarrollo del embrión ejercen una marcada influencia sobre los resultados de la transferencia de embriones. La

transferencia de una mórula temprana resulta en menores tasas de preñez que cuando se transfieren embriones de estadio más avanzado (Looney *et al.*, 2006). Hasler (2001) 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 diferentes estadios de desarrollo. Pudiendo esto ser debido a que transferir embrión cuyo desarrollo haya sido más rápido comparado con un contemporáneo de menor desarrollo podría traducirse en mayor expresión de factores de reconocimiento de preñez. (Block *et al.*, 2007) encuentra diferencias significativas en secreción de Interferón-tau en embriones de diferente tamaño ($p < 0,001$).

Stroud y Hasler, (2006) encontraron que la calidad del embrión contribuye significativamente con el éxito de la transferencia de embriones. Scenna *et al.* (2005) 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). Encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) para la preñez del grupo experimental; vale la pena resaltar que el modelo estadístico aparentemente no comparó 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% control (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 al.* (2009) evaluando cambios en los componentes del cultivo para producir embriones PIV, evaluó el efecto de añadir el glicoaminoglicano “hialuronan” sobre los embriones Holstein transferidos y analizaron las diferencias en tasas de preñez dependiendo el estadio de desarrollo al momento de la transferencia. Encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para las mórulas transferidas: 18,5% (15/81, control) y 28,6% (20/70, hialuronan) *versus* blastocitos expandidos: 38,3% (31/81, control) y 29,5% (23/78, hialuronan).

Si bien existe clara tendencia a que la tasa de preñez en embriones de calidad excelente y en embriones de mayor desarrollo sea mayor, en la aplicación comercial de la técnica no siempre es recomendable transferir solo embriones de calificación

excelente o solo embriones de desarrollo avanzado ya que el resultado final es cantidad 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.

3.2.2.3 Toros. El genotipo y fenotipo del embrión es diferente de la madre y el padre, este factor de individualidad le asigna a cada individuo características que lo hacen único. Por esto podría especular que podrían existir diferencias en tasa de preñez de embriones de acuerdo al padre.

En la literatura revisada no se encontró evidencia de que el toro usado para producir embriones PIV afecte la tasa de preñez en TE de embriones PIV, sin embargo Blondin *et al.* (2009) estudiando el efecto de la heparina en el proceso de fertilización en óvulos bovinos para producir embriones PIV, estudió diferentes materiales seminales tanto convencionales como sexados por citometría de flujo y evaluó si existían diferencias entre semen sexado y convencional y además comparó diferentes toros y su producción de blastocitos PIV. Encontraron que la producción de embriones con semen convencional es diferente ($p < 0,05$) a la producción de embriones con semen sexado (10,6% y 22,2% 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 al.* (2008) estudiaron el efecto del estrés térmico sobre los testículos de toros de la raza Nelore (*Bos taurus indicus*) encontrando que no existían 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 de testículos aparecen diferencias entre los animales comparando producción de blastocitos PIV ($p < 0,05$): 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 cuando analizan el espermograma de los toros estudiados y comparan 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, (2009), 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, transfirieron los embriones producidos con semen sexado y compararon la tasa de preñez contra embriones PIV y embriones de superovulación *In vivo*, encontrando que las tasa de preñez de los tres grupos es 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 solo se comparan los embriones producidos por los mejores en producción de embriones, queda la duda sobre qué hubiera sucedido si se comparan las preñeces de todos los toros?

3.2.3 Factores asociados al manejo del embrión post producción. Estos factores fueron incluidos ya que podrían afectar la supervivencia del embrión y por lo tanto las tasas de preñez. Debido a que la gran mayoría de los estudios realizados respecto a TE de embriones PIV son diseñados bajo parámetros en la mayoría controlados, de algunos los factores continuación descritos no se encontraron trabajos que sirvan de referencia bibliográfica.

3.2.3.1 Tiempo transcurrido entre entrega y transferencia. Este factor podría afectar si se tiene en cuenta que para montar el embrión en la pajilla cambia de medio y se alteran las constantes de ambiente que había en la incubadora y esto podría afectar las tasas de preñez. Respecto de este factor no se encontraron referencias.

3.2.3.2 Orden consecutivo de la transferencia de los embriones. El orden de la transferencia es directamente proporcional al tiempo transcurrido entre la entrega y la transferencia y tiene como factor adicional al técnico que podría afectar los resultados.

El análisis de este factor resultaría en conclusiones como la de hasta cuántos embriones puede transferir una sola persona o si en definitiva no hay un límite de acuerdo con las producciones estándar del laboratorio. No se encontraron referencias relacionadas con este factor.

3.2.3.3 Dificultad el momento de la transferencia. El hecho de depositar un embrión en el interior del cuerno uterino supone una invasión del tracto reproductivo, este procedimiento esta asociado posibles lesiones del endometrio y a la consecuente producción de PGF₂-alfa, lo que reduciría los índices de preñez (Scenna, 2005).

Barceló-Fimbres *et al.* (2009) en su estudio de TE de embriones PIV, analizaron los efectos de la dificultad al momento de la transferencia en la tasa de preñez, entre otros factores. Encuentran que las tasas de preñez resultado de transferencias realizadas sin ningún tipo de dificultad (n=40) son significativamente diferentes (p<0,05) comparadas con las transferencias realizadas con algún tipo de dificultad (n=33) que incluye movimientos bruscos de la receptora, receptoras problemáticas y/o evidencias de sangre en la pistola de TE. Esto resulta en 53% de preñez para las TE sin dificultad *versus* 21% de preñez en los casos el los que hubo alguna dificultad.

Se puede especular que si bien existen diferencias en las producciones 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.

4. MATERIALES Y METODOS

Con el fin de evaluar las variables que posiblemente tuvieran efecto sobre la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones de PIV se recolectaron datos de diferentes centrales de receptoras, los embriones transferidos fueron producidos por una empresa comercial especializada en el tema, para ubicar a los lectores además de la metodología propia del estudio se describirá someramente la técnica de PIV.

4.1 MARCO GEOGRÁFICO

El estudio se realizó en tres de las centrales de receptoras bajo la administración de la empresa productora de los embriones "Embriogen S.A.":

- Central de receptoras La Carolina, situada en el municipio de Tocaima, del departamento de Cundinamarca. Se encuentra ubicada a 287 metros de altura sobre el nivel del mar y a una temperatura promedio de 26°C. Los terrenos están situados a orillas del río Bogotá, con tierras en los cerros circundantes.
- Central de receptoras Escocia, situada en el municipio de Soledad del departamento del Atlántico a nivel del mar y con una temperatura promedio de 28°C.
- Central de receptoras Mararave, situada en el municipio de Yopal, del departamento del Casanare. Se encuentra ubicada a 360 metros sobre el nivel del mar con una temperatura promedio de 26°C.

La actividad principal de la fincas es proveer de receptoras para los embriones PIV provenientes del laboratorio de PIV Embriogen-Cenatte. Estas centrales están bajo la dirección técnica y supervisión sanitaria del laboratorio.

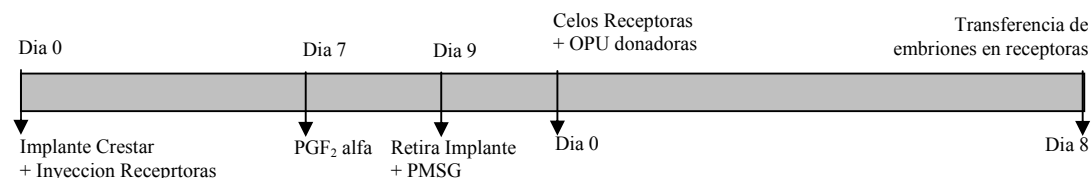
4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Selección y sincronización de las receptoras. La selección de las receptoras que ingresan al programa se realizó mediante un examen clínico para verificar la ciclicidad del animal, que no haya problemas evidentes de cérvix que puedan dificultar la transferencia y elimina del programa los animales de CC extremas (Vélez, 2003)

En los programas de transferencia de embriones se busca una sincronía entre el día del celo del ciclo estral de la receptora y la edad del embrión, la sincronización de receptoras se realizó de la siguiente forma:

Se insertó a nivel subcutáneo en la oreja un implante de liberación lenta de Norgestomet (3 mg), más una inyección intramuscular que contiene Valerato de Estradiol 5 mg y Norgestomet 3mg (Crestar[®], Laboratorios Intervet); al séptimo día se hace una aplicación de D-cloprostenol 0.15 mg IM (Cloprostenol[®], Laboratorios Calier); por último, el día noveno se retira el implante y se aplica PMSG 200 UI IM (Folligon[®], Laboratorios Intervet).

Figura 3. Esquema de sincronización de receptoras con Crestar[®], hasta el día de la transferencia.



4.2.2. Producción de embriones *in-vitro* (PIV). A continuación se describe brevemente el proceso de PIV. La empresa patrocinadora del proyecto no autoriza la publicación de elementos usados en el proceso, medios y/o suplementos usados, y se reserva el dominio sobre esta información que fue comprada mediante la figura de franquicia a Cenatte Embrioes, Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil.

4.2.2.1 Aspiración folicular. La vacas donadoras de oocitos correspondió a animales puros de razas Brahman Gris, Brahman Rojo y Gyr, que habían sido elegidos para ingresar el programa de mejoramiento genético por sus cualidades fenotípicas y/o genotípicas. La obtención de los oocitos se realiza mediante aspiración folicular con la ayuda de un equipo de ultrasonografía Aloka SSD500 con transductor ultra convexo UST9111 de 7.5 mHz y bomba de vacío Cook ref K-MAR 5100.

Los oocitos son buscados en el líquido de la aspiración con la ayuda de un estereoscopio Olympus SZ60, son puestos en tubos para microcentrífuga marca Eppendorf de 1.5ml poco tiempo después de la aspiración, para ser enviados al laboratorio manteniendo una línea de temperatura constante de 37°C.

Los procesos en el laboratorio fueron realizados con la ayuda de estereoscopios Nikon SMZ645, Japón, placa calentadora Electrovot, Brasil, todos los procedimientos fueron realizados en cabina de flujo laminar horizontal Veco, Brasil y el durante el tiempo de incubación de los procesos las estructuras fueron mantenidas en incubadoras Thermo 3130 bajo condiciones de humedad (+98%) temperatura (38,7 °C) y presión de CO₂ (5,5%) constantes. Los procesos de evaluación del semen descongelado y determinación de concentración de espermatozoides se realizó con la ayuda de un microscopio Nikon Eclipse M200 y cámara de Neubauer.

4.2.2.2 Maduración In-Vitro (MIV). Este proceso toma entre 22 y 26 horas, hormonalmente se maduran los oocitos quedando aptos para la fecundación.

4.2.2.3 Fecundación In-Vitro (FIV). Los espermatozoides fueron seleccionados mediante la técnica de gradientes de Percoll®, son puestos junto a los óvulos maduros durante 18 a 22 horas.

4.2.2.4 Cultivo In-Vitro (CIV). Previo a este proceso los óvulos son separados totalmente de los detritos de *cumulus oophorus* para ser depositados en el medio de cultivo, donde permanecen durante 5 días.

Todos los procesos son guiados por los protocolos de PIV estándar de la Franquicia Embriogen-Cenatte, propiedad de Cenatte Embrioes, Pedro Leopoldo, Minas Gerais Brasil.

4.2.3 Diagnóstico de preñez. La eficiencia del programa de transferencia fue medida en términos de la cantidad de preñeces obtenidas al día 60 del ciclo estral (día 60 de preñez) sobre total de embriones que se transfirieron. El diagnóstico se realizó en todas las receptoras transferidas, mediante palpación rectal y confirmada con ultrasonografía.

La preñez fue definida por la presencia de una vesícula amniótica observada por ultrasonografía y la viabilidad del embrión se determinó mediante la observación de fetocardia. Se utilizó un equipo Pie Medical Scanner 100 Falco Vet® con un transductor lineal de 8 mHz.

4.2.4 Pérdidas tempranas de gestación: Se evaluó la cantidad de pérdidas tempranas de gestación en el estudio. Según Kruij, y den Dass, (1997) las pérdidas tempranas de gestación en programas de transferencia de embriones de FIV es más elevada que en IA. Para el presente estudio se compararon los datos de preñez obtenidos a los 60 días con los obtenidos antes y después de este día. Los puntos para comparación fueron tomados de la siguiente forma:

- A. Día 35 de preñez
- B. Día 90 de preñez

Se definió como pérdida temprana de la gestación cuando hubo diferencia entre el número de preñeces mediante alguno de estos dos diagnósticos y la preñez al día 60.

4.3 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES

Las vacas receptoras fueron animales mestizos con cruces de las razas Angus, Pardo Suizo, Holstein y Braunvieh. Las hembras de este grupo fueron novillas y vacas, seleccionadas por ser cíclicamente normales, esto es tener celos regulares cada 18-21 días, no haber presentado anomalías o deformaciones serias en su tracto reproductivo, no presentar signos clínicos de enfermedades infectocontagiosas, tener

condición corporal promedio de 3 sobre 5 y poseer buena capacidad corporal para un buen desarrollo fetal y parto fácil. En las fincas a todas las receptoras se les realizó un protocolo sanitario preventivo contra enfermedades reproductivas y otras que pueden afectar la reproducción, que incluye vacunación contra DVB, IBR y Leptospirosis y una dosis de Penicilina-estreptomina, como tratamiento para posibles infecciones por leptospira.

El tamaño de la muestra fue escogido por conveniencia considerando la cantidad de vacas donadoras que fueron sometidas a OPU durante un periodo de tiempo de un año a partir septiembre de 2007. El presente estudio evaluó la información procedente de 1227 embriones que fueron transferidos en un número equivalente de receptoras. Para facilitar el análisis de las variables, éstas fueron dicotomizadas o categorizadas como se presenta a continuación:

4.3.1 Selección y clasificación de los embriones. La selección y clasificación de los embriones fue realizada siempre por el mismo técnico; siguiendo los parámetros establecidos por la IETS (2000).

4.3.1.1 Calidad del embrión. La clasificación morfológica se realizó de acuerdo a la clasificación de la IETS (2000). Los embriones que se tuvieron en cuenta para este estudio fueron los de calidad 1; (Excelente o bueno), donde la masa embrionaria es simétrica y esférica, con blastómeros individuales uniformes en tamaño color y densidad. El desarrollo del embrión es consistente con la fase del desarrollo esperada. Presenta irregularidades relativamente menores y por lo menos el 85% del material debe permanecer intacto dentro de la masa embrionaria. La zona pelúcida debe ser lisa y no debe tener ninguna superficie cóncava o delgada. Los embriones de clasificación 2, 3 y 4 no fueron tenidos en cuenta debido a que su viabilidad podría y afectar los resultados.

Para el propósito del análisis estadístico la calidad del embrión fue agrupada en las siguientes categorías:

- 0= Excelente: compromiso máximo del 5% de la masa embrionaria
- 1= Bueno: compromiso máximo del 15% de la masa celular embrionaria (Adaptado de IETS, 2000)

4.3.1.2 Estado de desarrollo del embrión. Debido a que en la práctica, alrededor del 80% de los embriones PIV se transfieren en el estado de blastocito expandido, para el estudio se agruparon los estadios de desarrollo según la IETS en dos grupos. Para el propósito del análisis estadístico se les asignaron las siguientes categorías

- 0= Estadios anteriores de Blastocito expandido: incluye desarrollos de mórula (4), blastocito inicial (5) y blastocito (6) .
- 1= Estadios que van desde blastocito expandido (7) en adelante: desarrollos , blastocito eclosionado(8) y blastocito eclosionado expandido (9) (adaptado de IETS. 2000).

4.3.2 Criterios de selección de las receptoras el día de la transferencia

4.3.2.1. Tamaño del Cuerpo Lúteo al momento de la transferencia. La evaluación del cuerpo lúteo fue realizada inicialmente por palpación rectal, para identificar en qué ovario se encuentra localizado. De manera adicional se realizó ultrasonido para verificar la presencia del mismo y para determinar el diámetro (cm) de las estructuras presentes en los ovarios. Los cuerpos lúteos fueron 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 (adaptado de Zemjanis, 1996):

- 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.

No se utilizaron receptoras cuyo diámetro de cuerpo lúteo no estuviera incluido en una de estas tres categorías.

4.3.2.2 Condición corporal. La condición corporal (C.C.) se registró en la escala de 1 a 5 donde 1 es muy flaca y 5 es obesa (Vélez, 2003). Las receptoras se agruparon en tres categorías con el fin de evaluar el efecto de condición corporal:

- 1= Flacas, C.C. <2,5

- 2= Normal, C.C. 2,5 – 4,0
- 3= Gordas, C.C. >4,0

4.3.2.3 Temperamento de la receptora. El temperamento se evaluó de acuerdo al comportamiento que mostró el animal al momento de la palpación el día de la transferencia. Se consideró un animal nervioso el que mostró intranquilidad excesiva, intentó salirse bruscamente del brete o lugar de palpación, mostró agresividad o se comportó de forma violenta y que de alguna forma entorpeció la labor del operario que transfirió los embriones. Las categorías fueron:

- 1= tranquila
- 2= nerviosa

4.3.2.4 Categoría de la receptora. Se tuvo en cuenta si la receptora ha tenido crías (vaca) o si no ha tenido ningún parto (novilla), categorizadas así:

- 1= Vaca
- 2. Novilla

4.3.2.5 Dificultad en la transferencia. Causar traumas en el endometrio el momento de la transferencia puede producir PGF2-alfa que afectaría negativamente la tasa de preñez (Scenna, *et al.*, 2005) La dificultad en la transferencia se basó en el tiempo en que se demoró el operario en depositar el embrión (mayor a 3 minutos) y/o por solicitud del técnico de realizar la anotación de dificultad causada por exceso de manipulación de un cérvix de difícil manejo o por úteros de tamaño muy grande que dificulten la transferencia. Las dificultades causadas por el temperamento de la receptora fueron tenidas en cuenta como una variable diferente.

Para el propósito del análisis estadístico se les asignaron los siguientes códigos:

- 0= No hubo dificultad
- 1= Hubo alguna dificultad

4.3.2.6 Número de transferencias consecutivas antes de quedar preñada. Según el historial de las receptoras se llevó el registro de la cantidad de transferencias

consecutivas a las que había sido sometida la receptora antes de quedar preñada o ser descartada del programa luego de cuatro transferencias (adaptado de McMillan, 1999; Looney, 2006).

- 0= Una transferencia
- 1= Dos transferencias
- 2= Tres transferencias o más

4.3.2.7 Evaluación de las pérdidas tempranas de la gestación. Se basó en la diferencia de las tasas de preñez encontradas entre los días 35, 60 y 90 días de preñez. Para este análisis solo se incluyeron los animales que resultaron gestantes al día 35.

4.3.3 Variables administrativas asociadas a la técnica de Transferencia de Embriones de PIV

4.3.3.1 Tiempo transcurrido entre la entrega de los embriones en el laboratorio en Bogotá y la transferencia en cada receptora. Analizando los datos recolectados de tiempo transcurrido entre la entrega de los embriones en el laboratorio y la transferencia a la receptora se determinó que el rango de tiempo es de 2 horas (menor valor) hasta 8.5 horas (valor mayor) con un promedio aritmético de 5 horas; por tal motivo se decidió categorizar la variable de la siguiente manera:

- 0= < 5 horas
- 1= >5 horas

4.3.3.2 Cantidad de embriones transferidos de forma consecutiva. A pesar que el orden consecutivo de la transferencia es directamente proporcional al tiempo transcurrido entre la entrega y la transferencia, existe un tiempo adicional que transcurre entre la llegada de los embriones al sitio de la transferencia y la transferencia de cada embrión, por esta razón se tuvo en cuenta como factor adicional que podría afectar los resultados ya que podría existir diferencias entre ellos. Fueron registrados y categorizados de la siguiente forma:

- 0= de 1 hasta 30 embriones transferidos
- 1= de 31 hasta 65 embriones transferidos

La agrupación de a 30 embriones transferidos fue debida a que se buscó encontrar que diferencia existió entre; transferencias promedio de 30 embriones y transferencias de número alto de embriones; más de 30.

4.3.3.3 Lado del útero donde se transfiere el embrión. Si bien no debería existir influencia entre el lado de la transferencia (cuerno derecho o izquierdo), los técnicos tienen mayor dificultad transfiriendo en alguno de los dos lados, lo que puede influir en las tasas de preñez, por esta razón se categorizó de la siguiente manera:

- 0= Embrión trasferido en el cuerno derecho
- 1= Embrión trasferido en el cuerno izquierdo

4.3.3.4 Experiencia del técnico. A pesar de que el entrenamiento de los técnicos es estándar de la franquicia, se tuvo en cuenta este factor para analizar posibles variaciones causadas por la individualidad de los técnicos. Se registraron dos categorías para esta variable:

- 0= experimentado
- 1= novato

Se considero con un técnico experimentado aquel que tiene más de un año de experiencia con más de 2000 embriones transferidos, y como técnico novato al que solo contaba con 2 meses de entrenamiento para ser técnico de transferencia para la empresa con cerca de 100 embriones transferidos.

4.3.3.5 Técnico. Este factor se tuvo en cuenta para poder analizar posibles variaciones causadas por la individualidad de los operarios. Se contó con 5 operarios que quedaron registrados para el análisis con una consecutiva de la A a la E.

4.3.3.6 Grupo racial de los embriones. Pueden existir diferencias entre tasas de producción de embriones y las tasas de preñez dependiendo del grupo racial. En el presente estudio fueron categorizadas de la siguiente forma:

- 0= Brahman Gris
- 1= Brahman Rojo

- 2= Gyr

4.3.3.7 Toros. Así como existen indicios de que la raza influye, también se tienen algunos datos que indicarían que el toro padre de los embriones (donante del semen usado para fertilizar los óvulos) puede ejercer influencia en los resultados, indicando que habría algún factor de individuo que afecta la preñez.

Se Codificaron los toros con mas de 35 observaciones y se categorizaron de A a L, la categoría M fue la agrupación del resto de los toros por menos de 35 observaciones.

4.3.3.8 Época del año. Los índices reproductivos a través de un ciclo anual varían. Franco et al (2006a) reporta cambios significativos en resultados de preñez en programas de inseminación artificial en las diferentes estaciones. Los datos recopilados a lo largo de un año y medio permitieron agrupar las categorías por las fechas, por lo que se decidió incluirlo en el modelo estadístico con las siguientes categorías:

Análisis por cuatrimestres

- 0= Diciembre, Enero, febrero y marzo
- 1= Abril, Mayo, junio y julio
- 2= Agosto, Septiembre, octubre y noviembre

La agrupación por cuatrimestre se realizó basándose en la dispersión de los datos recopilados donde se observó una disminución en los resultados de preñez en todas las centrales durante cuatro meses consecutivos iniciando en diciembre hasta el mes de marzo, siendo estos 4 meses los de menores resultados comparados con el resto del año.

4.3.3.9 Central de receptoras donde se transfirió el embrión. Debido a que el factor de manejo de cada finca (Halser, 2001) puede causar interferencia en los

resultados, se analizó el efecto de la Central donde se realizó el trabajo y se codificó de la siguiente forma:

- 0= Carolina
- 1= Mararave
- 2= Escocia

4.3.3.10 Origen del semen utilizado en PIV. El procedimiento de congelación puede ser un factor de influencia en los resultados, por esta razón se agruparon los toros usados en dos categorías dependiendo del origen:

- 0= Importado
- 1= Nacional

La recolección y tabulación de la información se hizo mediante un formulario, para así obtener los datos necesarios para el estudio (ver anexo A).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El modelo usado para el análisis de los factores relacionados al porcentaje de preñez incluyó las siguientes variables:

- Calidad del embrión
- Estado de desarrollo del embrión
- Tamaño del cuerpo lúteo
- Dificultad en la transferencia
- Número de transferencias
- Orden consecutivo de la transferencia de los embriones
- Lado del cuerno donde se transfiere el embrión
- Experiencia del técnico
- Grupo racial de los embriones
- Época del año
- Central de receptoras donde se transfirió el embrión
- Origen del semen utilizado en PIV
- Tiempo transcurrido entre la entrega de los embriones en el laboratorio en Bogotá y la transferencia en cada receptora

Para establecer causalidad y evaluar el grado de asociación se realizó una Regresión Logística con las categorías anteriormente citadas. La fortaleza de las asociaciones entre los factores evaluados y la tasa de preñez fue estimada mediante el cálculo de los Odds Ratio (OR) respectivos para cada variable. El OR fue calculado en el modelo de regresión logística así: $\exp(Xb) / [1 + \exp(Xb)]$. Adicionalmente se computaron los intervalos de confianza del 95%. Todas las variables cuyos valores p fueron < 0.05 se consideraron como estadísticamente significativas. El modelo final incluyó establecer si existen interacciones entre las variables. Todos los cálculos fueron realizados usando un software comercial (SPSS Inc., Chicago, IL. USA).

De acuerdo a las categorías anteriores, las variables fueron agrupadas y descritas usando estadística descriptiva y análisis de frecuencias. Además se confirmaron las asociaciones encontradas en la regresión logística mediante el análisis univariado usando el tablas de tablas contingencia de 2x2 de cada una de las variables comparadas con la preñez

No fueron tenidos en cuenta las siguientes variables debido a que los datos recolectados de cada una de ellas eran uniformes:

- Condición corporal: el proceso de selección de las receptoras en un programa comercial no permite que animales de condición corporal extrema entren a grupo de animales a ser trabajados, por esto se homogeniza el grupo no permitiendo el análisis.
- Temperamento de la receptora, se registraron muy pocas observaciones de receptoras agresivas al punto de entorpecer la transferencia, probablemente debido a que en las centrales de receptoras se trabajan los animales en el corral en varias ocasiones antes de la transferencia, este tipo de manejo constante hace que los animales que entran al brete no demuestren ser tan altivos como los que no tienen la misma intensidad de manejo.
- Categoría de la receptora: El manejo rutinario de las centrales es entregar los animales preñados de embrión al contratante de los servicios de PIV, estos animales son reemplazados por novillas ya que la compra de animales jóvenes es mas segura en cuanto a que baja el riesgo de comprar hembras con enfermedades reproductivas o con problemas reproductivos adquiridos, este tipo de manejo disminuye mucho el uso de vacas, homogenizando el grupo para esta variable.

6. RESULTADOS

Los datos se presentan agrupados por afinidad entre variables con el fin de facilitar la lectura.

6.1 VARIABLES ASOCIADAS A LA RECEPTORA.

Este grupo de variables incluye: Diámetro del cuerpo lúteo, dificultad en la transferencia, cantidad de transferencias consecutivas antes de quedar preñada, condición corporal, temperamento de la receptora y categoría de la receptora. Se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) (tabla 5), para dificultad de la transferencia (hubo dificultad: 11% contra No hubo dificultad 39%) no hubo diferencias ($p > 0,05$) para diámetro de cuerpo lúteo ($< 10\text{mm}$: 28%, $10\text{-}14\text{mm}$: 39% y $> 14\text{mm}$ 39%), tampoco para número de transferencias consecutivas antes de quedar preñada (1: 39%, 2: 37% y 3 o más 33%) (Tabla 1).

Tabla 1. Tasa de preñez para las variables asociadas a la receptora.

Diámetro Cuerpo lúteo	Transferidos	Preñadas	% preñez
<10mm	133	37	28%
10 - 14 mm	574	223	39%
> 14mm	520	202	39%
Dificultad en la transferencia			
HUBO	79	9	11%
NO HUBO	1148	453	39%
Cantidad de TE Consecutivas			
1	778	302	39%
2	292	108	37%
≥3	157	52	33%
Condición corporal			
Flaca	2	0	0%
Normal	1211	458	38%
Gorda	14	4	29%
Temperamento			
Tranquila	1224	462	38%
Nerviosa	3	0	0%
Categoría reproductiva			
Vaca	6	2	33%
Novilla	1221	460	38%
transferidos Preñadas % preñez			
Total	1227	462	38%

Debido a la escasa cantidad de datos en algunas de sus categorías se excluyeron del estudio las siguientes variables: condición corporal, temperamento y categoría reproductiva (tabla 1).

6.2 VARIABLES ASOCIADAS AL EMBRIÓN.

Este grupo de variables incluye: Estado de desarrollo del embrión transferido, calidad del embrión, grupo racial del embrión, origen del toro usado en PIV y toro usado en PIV. Se encontraron diferencias significativas ($p=0,001$) para la variable calidad del embrión cuando se comparó la tasa de preñez con la calidad del embrión transferido (tabla 5), para calidad excelente 39% contra 21% de calidad bueno. No se encontró

diferencias ($p>0,05$) para las variables desarrollo del embrión, grupo racial, origen del toro usado en la PIV y toro usado para la PIV (tabla 2).

Tabla 2. Tasa de preñez para las variables asociadas al embrión transferido.

Desarrollo del embrión	Transferidos	Preñadas	% preñez
Mo (4), Bi (5) y Bl (6)	138	34	25%
Bx (7), Be (8) y Bex (9)	1089	428	39%
Calidad del embrión			
Excelente	1126	441	39%
Bueno	101	21	21%
Grupo racial			
Brahman Gris	1067	403	38%
Brahman Rojo	55	17	31%
Gyr	105	42	40%
Origen del toro usado en PIV			
Importado	893	315	35%
Nacional	334	147	44%
Toro usado para PIV			
	Transferidos	Preñadas	% preñez
A	55	18	33%
B	77	32	42%
C	70	26	37%
D	140	50	36%
E	65	25	38%
F	47	23	49%
G	39	6	15%
H	57	23	40%
I	93	27	29%
J	52	24	46%
K	97	49	51%
L	35	15	43%
m	400	144	36%
Total			
	Transferidos	Preñadas	% preñez
	1227	462	38%

Mo= Morula, Bi= blastocito inicial, Bl= blastocito, Bx= blastocito expandido, Be= blastocito eclosionado, Bex= blastocito eclosionado expandido

6.3 VARIABLES ASOCIADAS AL TÉCNICO QUE TRANSFIERE LOS EMBRIONES.

Este grupo de variables incluye: Cantidad de embriones consecutivos transferidos, Lado de la transferencia, experiencia del técnico y el técnico. Para estas variables no se encontraron diferencias ($p>0,05$) cuando el modelo las comparó con la tasa de preñez (tabla 3).

Tabla 3. Tasa de preñez para las variables asociadas técnico que transfiere el embrión

Cantidad de embriones	Transferidos	Preñadas	% preñez
1 - 30	1017	396	39%
31 - 62	210	66	31%
Lado de la transferencia			
Derecho	746	282	38%
Izquierdo	481	180	37%
Experiencia del Operario			
Experimentado	1132	434	38%
Novato	95	28	29%
Técnico			
Experimentado A	191	72	38%
Experimentado B	845	315	37%
Experimentado C	96	47	49%
Novato A	70	22	31%
Novato B	25	6	24%
Total			
	Transferidos	Preñadas	% preñez
	1227	462	38%

6.4 VARIABLES ASOCIADAS AL MANEJO DEL EMBRIÓN POST PRODUCCIÓN EN EL LABORATORIO

Este grupo de variables incluye: tiempo transcurrido entre la entrega de los embriones en el laboratorio y la transferencia, época en la que se realizó la transferencia y, central en donde se transfirieron los embriones. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) para la variable tiempo hasta la transferencia (tabla 5), para la categoría de 2 a 5 horas la tasa de preñez fue de 42% mientras que para en intervalo entre 5,1 y 8,5 horas fue de 33% (tabla 4).

Tabla 4. Tasa de preñez para las variables asociadas al manejo del embrión post producción y de acuerdo a la época del año en que se produjo.

Tiempo hasta la TE	Transferidos	Preñadas	% preñez
<5 horas	651	271	42%
>5 horas	576	191	33%
Época por Cuatrimestre			
dic- ene-feb-mar	335	96	29%
abr-may-jun-jul	516	206	40%
ago-sep-oct-nov	376	160	43%
Central de receptoras			
Centro del país	616	243	39%
Llanos orientales	286	120	42%
Costa atlántica	325	99	30%
Total			
	Transferidos	Preñadas	% preñez
	1227	462	38%

6.5 MODELO ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados primero usando estadística descriptiva, en segundo lugar se realizó un análisis univariado usando tablas de contingencia de 2 x 2 para estimar el grado de asociación individual de cada una de las variables con el resultado final (tasa de preñez), el grado de asociación se calculó a través del Odds Ratio en todos aquellos casos en que fue posible, de manera adicional se calculó el respectivo intervalo de confianza del 95 %, y el valor de p usando Chi-Cuadrado (Tabla 5, Anexo B). Finalmente, el modelo final fue obtenido luego de utilizar un análisis multivariado de regresión logística binaria con el objetivo de establecer cuáles de las variables estaban realmente asociadas con las tasas de preñez. El grado de asociación fue estimado al igual que en el análisis univariado a través del Odds Ratio con sus respectivos intervalos de confianza del 95 % y el valor de p luego de utilizar Chi-Cuadrado en todos los casos usando SPSS (Inc, Chicago, IL. USA).. Adicionalmente, se evaluaron las posibles interacciones entre variables. (Tabla 5, Anexo C):

Tabla 5 Análisis univariado para los factores asociados con las tasas de preñez en programas de transferencia de embriones producidos *in vitro* en razas cebuínas

Variable	Categorías De referencia	Valor- p	Odds Ratio	I.C. 95.0% ^b	
				Bajo	Alto
Calidad del Embrión	Excelente ^a Bueno ^a	0.000 ^c	0.408	0.248	0.669
Diámetro del cuerpo luteo	<10mm ^a 15 – 15 mm ^a >15mm ^a	0.046 ^c	d		
Dificultad durante la trasferecia	Fácil ^a Difícil ^a	0.000 ^c	0.197	0.098	0.399
Tiempo a trasferecia desde que el embrión sale del laboratorio	< 5 horas ^a > 5 horas ^a	0.002 ^c	0.696	0.551	0.878
Cantidad de embriones consecutivos transferidos	1 – 30 ^a 31 – 60 ^a	0.041 ^c	0.719	0.523	0.897
Toro usado para la PIV	(13 categorías de los toros mas usados) ^a	0.018 ^c	d		
Epoca del año en la que se transfieren los embriones	Dic, ene, feb mar ^a Abr, may, jun, jul ^a Ago, sep, oct, nov ^a	0.021 ^c	d		
Central de receptoras donde se transfieren los embriones	Centro del país ^a Llanos orientales ^a Costa atlántica ^a	0.006	d		
Procedencia del semen usado en la PIV	Nacional ^a Importado ^a	0.003	1.467	1.136	1.895

a. Categoría de referencia

b. Intervalo de Confianza del 95 %.

c. Valores de p < 0.05 son considerados como estadísticamente significativos

d. No se calculo el Odds Ratio, n<5

Tabla 6 Modelo de regresión logística binomial para los factores asociados con las tasas de preñez en programas de transferencia de embriones producidos *in vitro* en razas cebuínas.

Variable	Categorías de referencia	Valor- p	Odds Ratio	I.C. 95.0% ^b	
				Bajo	Alto
Calidad del Embrión	Excelente ^a Bueno ^a	0.001 ^c	2.3	1.4	3.9
Dificultad durante la trasferecia	Fácil ^a Difícil ^a	0.001 ^c	5.1	2.5	10.3
Tiempo a trasferecia desde que el embrión sale del laboratorio	< 5 horas ^a > 5 horas ^a	0.003 ^c	1.4	1.1	1.8
Origen del semen Utilizado para PIV	Importado ^a Nacional ^a	0.012	0.7	0.6	0.9

a. Categoría de referencia

b. Intervalo de Confianza del 95 %.

c. Valores de p < 0.05 son considerados como estadísticamente significativos

6.6 PÉRDIDAS TEMPRANAS DE LA GESTACIÓN.

Se evaluaron las preñeces el día 35 aproximadamente y de nuevo hacia el día 60. Se encontró que las pérdidas de gestación en este lapso son muy pocas: 25 pérdidas (5%) para el lapso entre los 35 y los 60 días y 16 pérdidas de los 462 preñeces de embriones PIV transferidos (3%) para el lapso de 60 a 90 días. La pérdida total de gestaciones que se habían sido confirmadas a los 35 día fue del 8% (41 pérdidas).

7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

7.1 VARIABLES ASOCIADAS A LA TASA DE PREÑEZ

7.1.1 Dificultad al momento de la transferencia

El modelo de regresión mostró que la variable Dificultad en la transferencia está asociada a la tasa de preñez ($p < 0,001$, OR 5,071 IC 95%), resultado que concuerda con Scenna (2005), quien en su estudio advierte de las posibles implicaciones de la producción de PGF₂-alfa en las tasas de preñez, esta producción de prostaglandina está dada por lesiones al endometrio durante la transferencia. Barceló-Fimbres *et.al.* (2009) también encuentra que las transferencias sin problema tienen tasa de preñez mayores que aquellas con algún tipo de problema. Esto podría explicar las bajas de preñez en este trabajo: es posible que la dificultad en la transferencia cause manejo excesivo del útero que al lesionarse produzca PGF₂-alfa y la tasa de preñez sea diferente por este motivo.

7.1.2 Calidad del embrión transferido

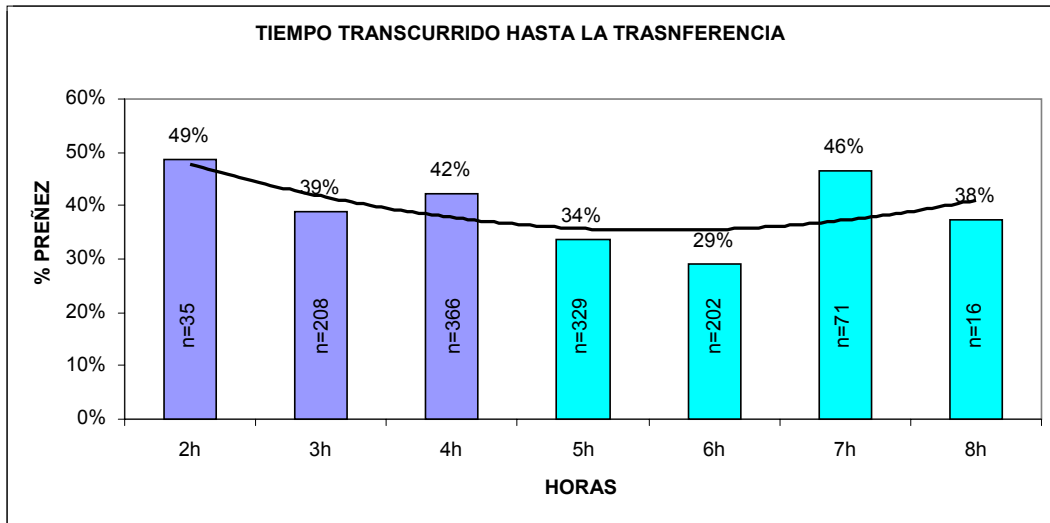
El modelo mostró que la variable calidad del embrión está asociada a la tasa de preñez ($p = 0,001$, OR 2,280 IC 95%). Este resultado coincide con los hallazgos de varios autores cuando analizan embriones de TE convencional. Peixoto *et.al.*, 2007 encuentran mayores tasas de preñez en embriones de mejor calidad comparados con los de calidades inferiores: 66, 62 y 52% para las calidades 1, 2 y 3 respectivamente (n 6650). En el presente trabajo se clasificaron los embriones como buenos y excelentes, siendo la tasa de preñez a favor de los embriones excelentes. Si bien los embriones PIV tienen un desarrollo un poco más rápido, los patrones de calidad citados por la bibliografía (IETS, 2000), son válidos cuando se clasifique un embrión PIV y se especule sobre su supervivencia post transferencia.

Es probable que los embriones de calidad superior tengan mejor expresión de los mecanismos de reconocimiento materno de la gestación tipo interferon-tau, peor no se encontró evidencia en la literatura revisada al respecto..

7.1.3 Tiempo transcurrido entre la salida de los embriones de laboratorio y la transferencia

El modelo mostró que la variable Tiempo transcurrido entre la entrega de los embriones en el laboratorio y la transferencia esta asociada a la tasa de preñez ($p < 0,05$, OR 1,434 IC 95%). Esto puede ser debido a que cuando los embriones van a ser empaquetados en las pajillas de 0,25ml tiene ser cambiados al medio de transporte, el tiempo transcurrido en este medio hasta la transferencia en una receptora puede ser deletéreo para el embrión. Esto sumado a las oscilaciones de temperatura desde la incubadora ($38,5^{\circ}\text{C}$), transporte donde se puede reducir hasta 33°C , y la posterior transferencia ($38,9^{\circ}\text{C}$, temperatura fisiológica de la vaca) Estos factores podrían influir en la fisiología del embrión comprometiendo su supervivencia post transferencia, vale la pena anotar que en la bibliografía consultada no se encontraron datos que soporten este supuesto. Si se observa la grafica de los resultados hora por hora no se observa un tendencia definida (Figura 4) incluso los menores valores están ubicados en el medio (5 y 6 horas, 34% y 29% respectivamente) y los valores superiores está ubicados en los extremos opuestos (2 y 7 horas, 49% y 46% respectivamente). Esto posiblemente es debido al número reducido de observaciones para las horas 7 (n 71) y 8 (n16) afecte la tendencia que debería ser clara para esta variable. Que la duda que que sucede con los embriones transferidos después de la hora 9?

Figura 4. Tasa de preñez respecto al tiempo transcurrido entre la entrega de los embriones en el laboratorio y la transferencia del embrión.



7.2 VARIABLES NO ASOCIADAS A LA TASA DE PREÑEZ

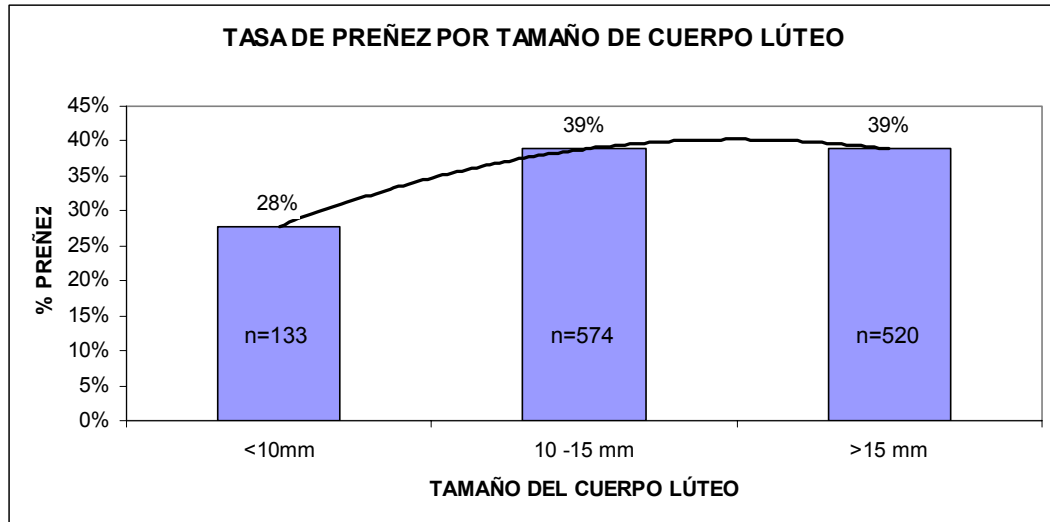
7.2.1 Variables relacionadas a la receptora.

Las variables no asociadas con la tasa de preñez en este grupo fueron ($p > 0,05$ IC 95%): Diámetro del cuerpo lúteo, cantidad de transferencias consecutivas antes de quedar preñada.

En cuanto a la variable Diámetro del cuerpo lúteo, no se encontró que este asociada a la tasa de preñez ($p > 0,05$). Sin embargo, se observa una tendencia a la disminución de la tasa de preñez para los cuerpos lúteos de menos de 10 mm (Figura 5). Esto puede ser debido a que un cuerpo lúteo pequeño secreta menos progesterona para mantener la preñez del embrión transferido. Binelli *et.al.*(2001) afirma que la tasa de preñez es diferente de acuerdo al tamaño de cuerpo lúteo.

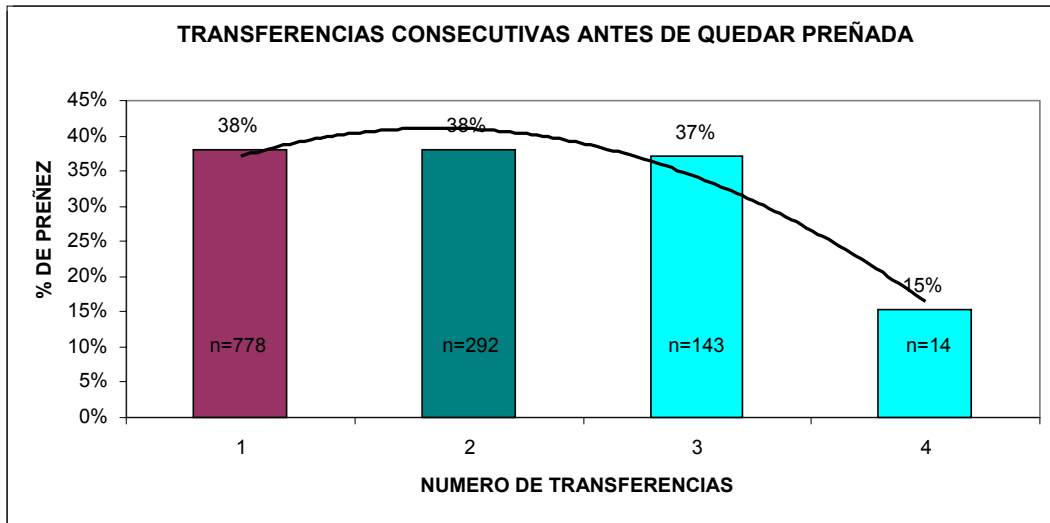
Esto genere la inquietud de determinar cual es el diámetro mínimo de lo cuerpo lúteo al momento de la transferencia que no afecte la tasa de preñez

Figura 5: Porcentaje de preñez por tamaño de cuerpo lúteo, al momento de la transferencia del embrión.



El modelo no detectó asociación ($p > 0,05$ IC 95%) entre la tasa de preñez y la variable Número de transferencias consecutivas antes de quedar preñada la receptora probablemente porque se agruparon los datos de las categorías de 3, 4 y 5 debido a que el número de éstas dos últimas era muy pequeño ($n=13$ y $n=1$, respectivamente). Sin embargo, en la gráfica se observa la tendencia de un decrecimiento en el porcentaje de preñez a partir de la cuarta transferencia (Figura 6).

Figura 6. Porcentaje de preñez de acuerdo a la cantidad de transferencias consecutivas a una misma receptora antes que quedar preñada.

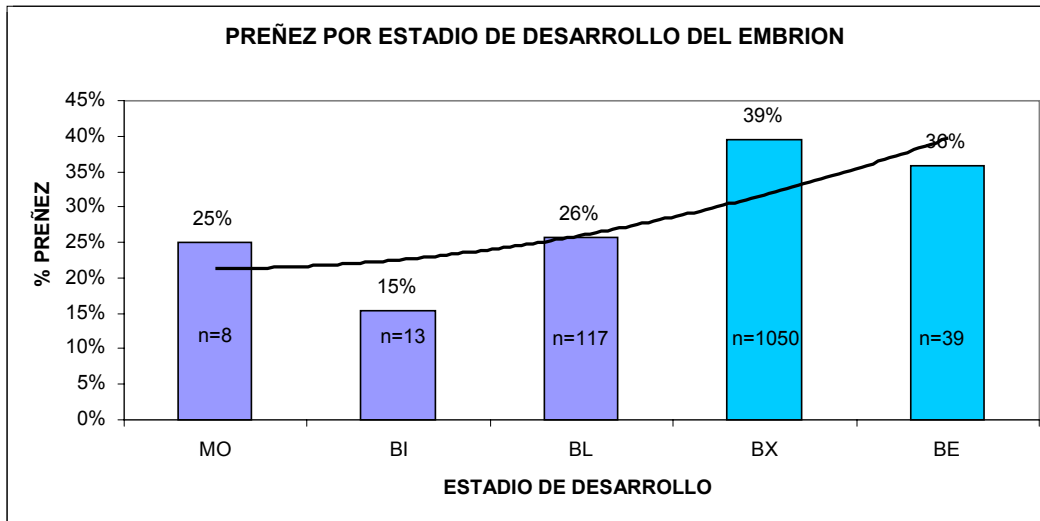


7.2.2 Variables relacionadas al embrión.

Las variables no asociadas con la tasa de preñez en este grupo fueron: estado de desarrollo del embrión transferido, grupo racial del embrión, origen del toro usado en PIV y toro usado en PIV.

El modelo encontró que el estadio de desarrollo del embrión no está asociado a la tasa de preñez ($p > 0,05$ IC 95%). Estos resultados son diferentes a las conclusiones de Block (2009) quien reportó diferencias significativas en la tasa de preñez de mórulas y blastocitos versus la tasa de preñez de blastocitos expandidos (18% Vs 38% respectivamente). Puede ser que el modelo de regresión logística no haya detectado y calculado el nivel de asociación a debido al reducido número de embriones de desarrollo retardado transferidos ($n=138$) contra los embriones de desarrollo avanzado ($n=1089$) (Figura 7).

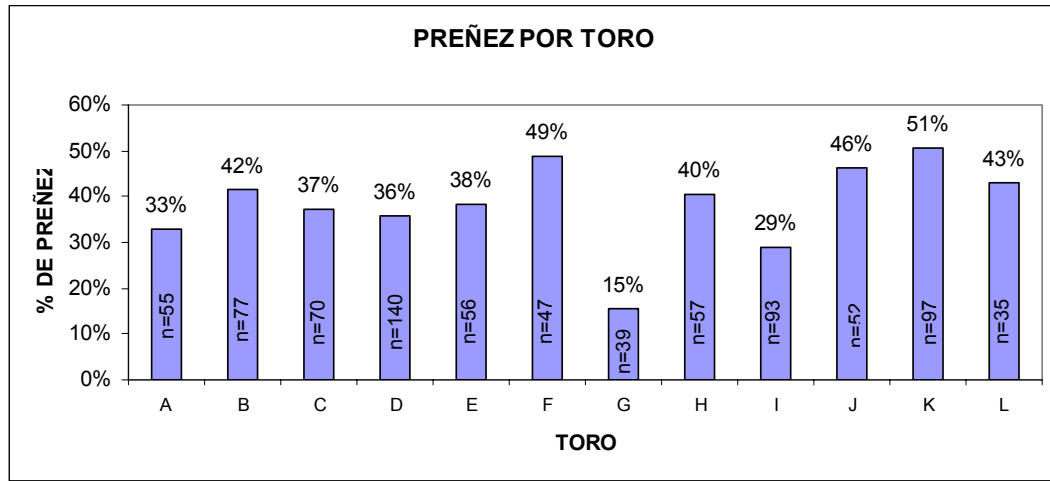
Figura 7. Tasa de preñez de acuerdo al desarrollo del embrión transferido.



Para grupo racial no se encontró asociación entre las razas Brahman, Brahman Rojo y Gyr con la tasa de preñez ($p > 0,05$ IC 95%), siendo los porcentajes de preñez muy parecidos entre si (38%, 31% y 40% respectivamente) Vale la pena resaltar que el número de embriones de Brahman Rojo transferidos fue bajo comparado con Brahman y Gyr (55, 1067 y 105 respectivamente) explicando esto, parcialmente, la baja aparente en la preñez del Brahman Rojo. También es posible que haya un efecto de raza que podría ser analizado en trabajos posteriores con una muestra mayor de embriones transferidos.

La asociación entre tasa de preñez y toro se intento calcular mediante dos variables: el toro como individuo y el origen del semen usado para la PIV. El análisis de regresión logística para las dos resultó en que no hubo asociación entre ellas y la tasa de preñez. El análisis univariado de tablas 2x2 mostró una tendencia de algunos individuos de producir menos preñeces que otros bajo las mismas condiciones de PIV (Figura 8).

Figura 8. Tasa de preñez por Toro usado en la PIV.



Blondin *et.al.* (2009) Encuentra que durante el proceso de FIV los diferentes toros tienen diferentes concentraciones de heparina para una producción óptima de embriones, es probable que el proceso estandarizado hasta el momento para capacitar espermatozoides necesite todavía ser perfeccionado para evitar estas variaciones que podrían ser la causante de que algunos toros tengan tasa de preñez mas baja que otros.

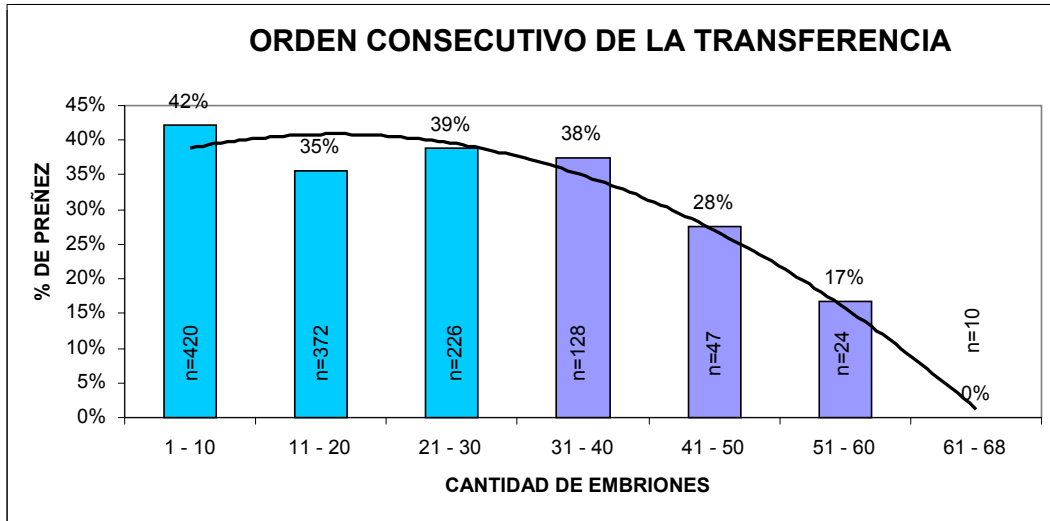
7.2.3 Variables relacionadas al técnico que transfiere los embriones

Las variables no asociadas con la tasa de preñez en este grupo fueron: cantidad de embriones consecutivos transferidos, lado de la transferencia, experiencia del técnico y el técnico

Para este grupo de variables el análisis de regresión logística no asociación con tasa de preñez para ninguna de ellas ($p > 0,05$ IC 95%). Resultados que contrastan con los de Chebel (2008) que encontró diferencias ($p < 0,001$, $n = 651$) para la variable técnico, relacionada con la tasa de preñez. Las observaciones en el modelo de análisis univariado arrojan resultados similares. Para la variable cantidad de embriones consecutivos transferidos se observó una tendencia a la disminución en las tasas de preñez cuando se pasa de los 40 embriones transferidos (Figura 9). Se puede especular que esto es causado por el cansancio del técnico que transfiere, en un día de trabajo en promedio se transfieren 40 embriones y el tiempo que toma transferir

esta cantidad de embriones es de dos horas. Este trabajo continuo sin descanso podría causar tensión y cansancio al final de la serie.

Figura 9. Tasa de preñez, por grupos de 10 embriones transferidos consecutivamente por el mismo técnico.



Es probable que no se haya detectado diferencias por el modelo porque la cantidad de embriones transferidos por los novatos es pequeña comparado con la cantidad de embriones transferidos por los experimentados (95 y 1132 respectivamente). También es probable que los técnicos de transferencia de embriones adquieran experiencia muy rápida y que en un estudio de larga duración tienda a desaparecer la diferencia a medida que avanza el tiempo. Se observa entre los técnicos novatos, que el novato A obtuvo 31% de preñez y se acerca al promedio de preñez total del trabajo 38%, mientras el novato B presentó un promedio de preñez de 24%. La diferencia en tiempo de entrenamiento entre los dos es de un mes a favor del novato A, sugiriendo esto que el tiempo para adquirir experiencia es corto.

Otra posibilidad es que un técnico con 100 embriones transferidos ya tenga la experiencia necesaria para que sus resultados sean similares a los resultados de los técnicos experimentados.

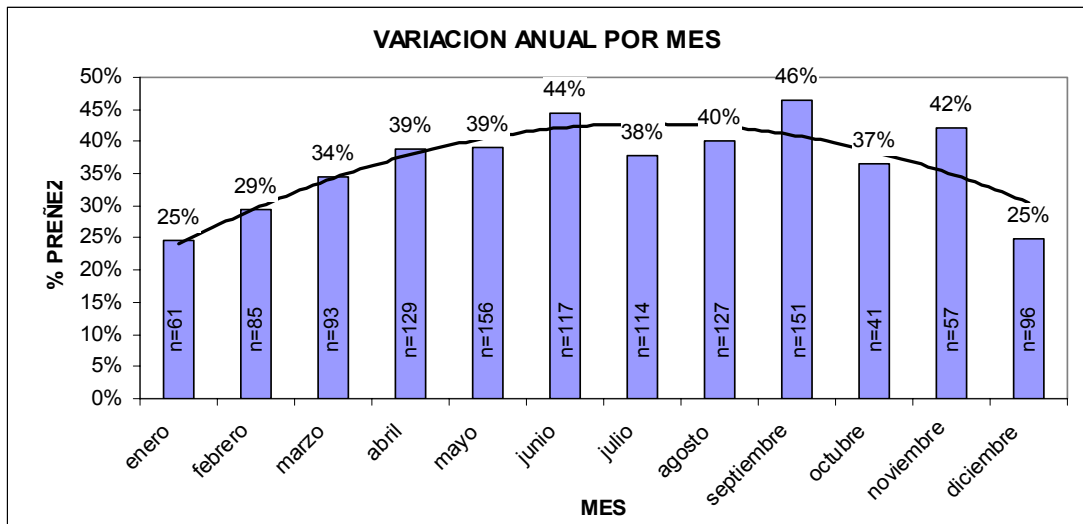
7.2.4 Variables relacionadas al manejo post producción de los embriones

Las variables no asociadas con la tasa de preñez en este grupo fueron: época en la que se realizó la transferencia y central en donde se transfirieron los embriones

Para le época en la que se realizó la transferencia no se encontró asociación con la tasa de preñez ($p > 0,05$ IC 95%), resultado que concuerdan con los hallazgos de Hasler (2001) quien afirma que no hay diferencias en tasas de preñez en TE convencional en las estaciones del año.

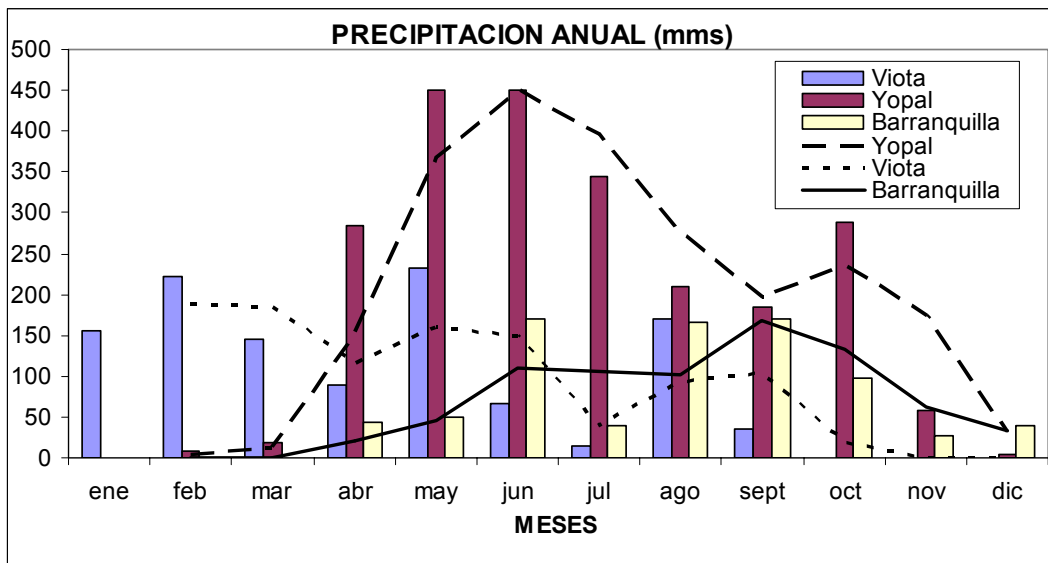
Se han reportado resultados contrarios; Block y Hansen (2007) y Chebel *et.al.* (2008) afirman que sí existen diferencias en las tasas de preñez de los meses de frío y los meses de calor. Estos resultados contradictorios pueden ser debidos a que algunos estudios escogen las estaciones extremas para sus muestreos (verano e invierno) exponiendo a estrés térmico (frío extremo y calor extremo) a los animales durante los muestreos y sesgando los resultados. El análisis univariado de tablas 2x2 de esta variable con respecto a las tasas de preñez revela una tendencia de disminución de las tasas de preñez en los meses del cuatrimestre comprendido con: diciembre, enero, febrero y marzo, respecto del resto del año (Figura 10). Vale la pena anotar que estos cuatro meses consecutivos son los de menor tasa de preñez del año, y en las tres centrales de transferencia de embriones se observó la misma tendencia

Figura 10. Distribución de las tasa de preñez, por mes, en un año.



Esta variación podría ser debida al régimen de lluvias de Colombia, pero cuando se analizó la información obtenida del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM, 2009) proveniente de las estaciones meteorológicas cercanas a las centrales. Aeropuerto de Barranquilla (Atlántico), Aeropuerto de Yopal (Casanare) y Estación de Viotá (Cundinamarca), se encontró que los regímenes de lluvias son diferentes para los tres lugares. Si se analizan los meses de enero y febrero se observa que mientras en Viotá fueron los meses de mayor pluviosidad, para Yopal y Barranquilla fueron los meses más secos; por el contrario para el bimestre que comprende los meses de Junio y Julio, el periodo más seco fue para Viotá mientras que fue uno de los mas lluviosos para Yopal y de pluviosidad media para Barranquilla (Figura 11). Pareciera ser que el régimen de lluvias no es el causante de la variación anual observada en el trabajo, posiblemente porque en las centrales existe la práctica de suplementación con silo de maíz o heno en las épocas donde escasea el forraje verde en los potreros.

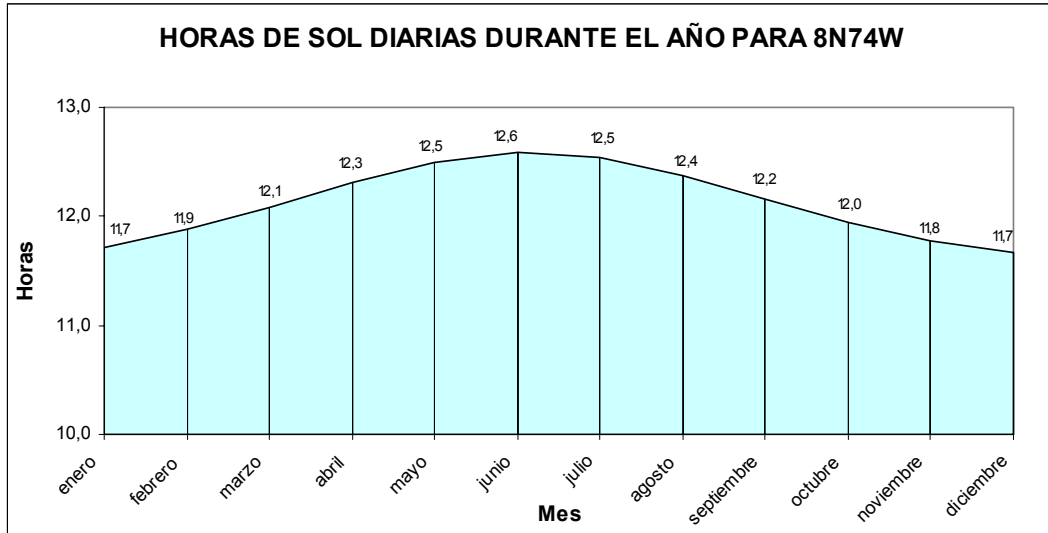
Figura 11. Pluviosidad en las diferentes regiones donde se encuentran ubicadas las centrales de receptoras, variación mensual en el año (IDEAM).



Otro aspecto que parece afectar la reproducción de los bovinos es la estacionalidad. En los países con estaciones hay una diferencia marcada en la duración de los días dependiendo de la época del año donde en el verano la cantidad de horas de sol es mayor que en invierno. En Colombia a pesar de no existir estacionalidad por estar

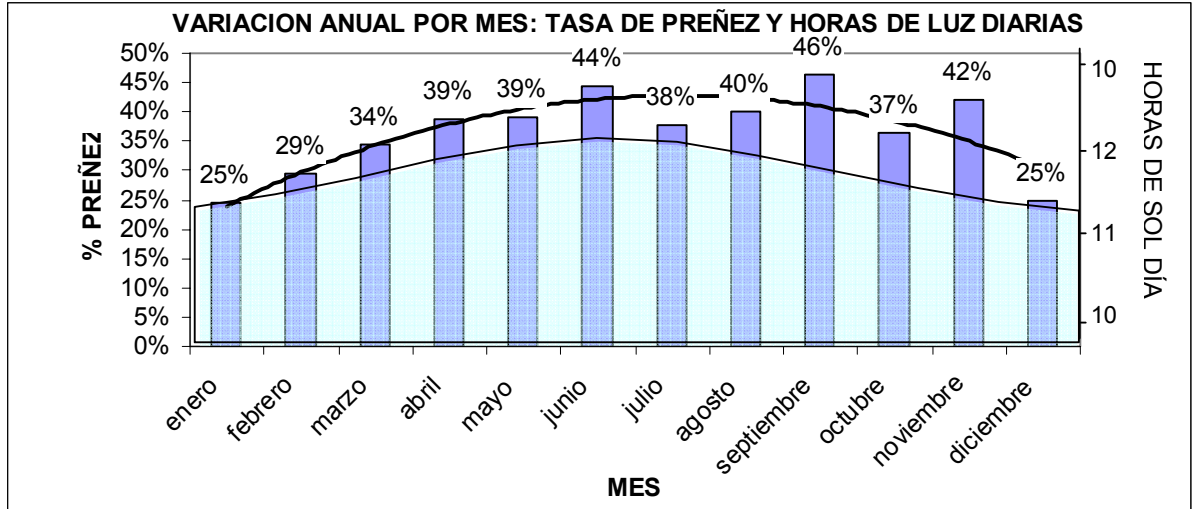
situado en el trópico, los animales parecen ser afectados por la estacionalidad. La variación puede ser de hasta una hora en los extremos; julio 21 tiene un total de 12,6 horas de luz mientras que diciembre 20 cuenta con 11,7 horas (Figura 12).

Figura 12. Promedios mensuales de horas de luz diaria a lo largo del año, para una ubicación en el centro Colombia (8,0N 74,0W; Modificado de Giesen in <http://www.jgiesen.de/daylight/>).



Quando se compara la duración los días de la figura anterior con la preñez obtenida mensual (figura 7) llama la atención que la tendencia de la preñez a lo largo del año se comporta de manera similar a la duración de los días para Colombia, la menor tasa de preñez del año fue observada en los meses de diciembre y enero (25%), concordando con los meses cuyos días tienen la menor cantidad de horas de luz diarias. Cuando se comparan los días de mayor cantidad de horas de luz (junio) con la tasa de preñez se encuentra que para este mes la tasa de preñez es una de las mayores del año (44%; figura 13).

Figura 13. Tasa de preñez mensual (grafica de barras) comparado con el promedio mensual de duración de los días (representado como área bajo la curva) para una locación en 8,0N 74,0W.



Respecto a la central dónde se realizó la transferencia no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$). Resultados que contrastan con los hallazgos de Stroud *et.al.* (2006) quienes encuentran diferencias en los resultados de diferentes fincas en donde el mismo equipo realiza TE. Esto puede ser debido a que en el trabajo citado las administraciones son totalmente diferentes pudiendo esto sumar factores que afecten los resultados, mientras que en este modelo las administraciones son guiadas por los lineamientos técnicos y administrativos de la empresa productora de los embriones, haciendo un poco más homogéneas las administraciones.

7.3 PERDIDAS TEMPRANAS DE GESTACIÓN

De las gestaciones que habían sido diagnosticadas al día 35 de preñez, 25 de ellas se perdieron entre los 35 y 60 días de preñez. En el lapso de los 60 días de preñez y los 90 días se perdieron 16 gestaciones. Se observa que el 80% de las pérdidas fueron entre el día 35 de preñez y el día 60 sugiriendo esto que la gestacion poria ser mas susceptible a factores abortivos el el lapso de 35 a 60 días que el el lapso de 60 a 90 días. Las pérdidas totales al día 90 sumaron 31 (8%), este porcentaje es bueno comparado con las pérdidas reportadas por block *et.al.* (2007) quien reporta pérdidas de gestación de entre el 9 y el 13 % entre los días 30 a 45 de preñez para embriones

de PIV de grupo control y de grupo experimental suplementados con IGF-1. Este buen resultado para la baja en pérdidas de preñez del presente estudio puede ser debida al tratamiento preventivo de las receptoras al la llegada al programa de transferencia d embriones sumado esto un posible efecto benéfico provocado por la selección previa realizada antes de cada programa de TE al eliminar del programa animales con úteros con tamaño o tono aumentado que de alguna forma dificulte la implantación o la placentación adecuada de los embriones.

8. CONCLUSIONES

Los embriones PIV clasificados como excelentes de las razas cebuínas Brahman Gris, Brahman Rojo y Gyr (*Bos indicus*), tuvieron 2.3 veces mayor posibilidades de generar una preñez que aquellos embriones que fueron clasificados como buenos (OR= 2.3, 95%CI (1.4-3.8), p= 0.01)

Los embriones transferidos sin dificultad, de las razas cebuínas Brahman Gris, Brahman Rojo y Gyr (*Bos indicus*) producto de PIV, tuvieron 5,0 veces mas posibilidad de culminar en una preñez, comparados con aquellos en los cuales hubo mayor dificultad para pasar el cervix (OR= 5.0, 95% CI 2.5-10,3, p <0.05)

Los embriones transferidos en un lapso de tiempo inferior a 5 horas transcurridas desde el momento de salir del laboratorio a la transferencia, de las razas cebuínas Brahman Gris, Brahman Rojo y Gyr (*Bos indicus*) producto de PIV, tuvieron 1.4 veces mas oportunidades de terminar en una preñez que aquellos que fueron trasferidos con mas de 5 horas después de haber salido del laboratorio (OR= 1.4, 95% CI 1.2- 1.9, p <0.05).

Los factores que no parecen influir de manera importante en la tasa de preñez de los programas de trasferencia de embriones PIV en las razas cebuínas Brahman Gris, Brahman Rojo y Gyr (*Bos indicus*) fueron:

- Diámetro del cuerpo lúteo al momento de la transferencia
- Cantidad de embriones transferidos en forma consecutiva por un técnico
- Toro usado en la PIV
- Época del año
- Central en donde estaba ubicadas las receptoras
- Etapa de desarrollo del embrión
- Transferencias consecutivas en una receptora antes que quedar preñadas
- Lado del útero donde se deposita el embrión en la transferencia.
- Experiencia del técnico
- Técnico como individuo
- Raza del embrión

Se debe considerar la posibilidad de evaluar en estudios posteriores estas variables con un número mayor de animales o diseñar un trabajo investigativo que elimine la uniformidad de los grupos problema, para comprobar si estas tendencias muestran diferencias estadísticas comparadas con la tasa de preñez.

Es probable que el manejo dado a las receptoras en el presente estudio haya causado que las pérdidas estacionales después del día 35 de preñez hasta el día 90 hayan sido pocas, comparando con literatura que reporta pérdidas mayores en transferencia de embriones PIV..

9. RECOMENDACIONES

Las siguientes recomendaciones aplican tanto para investigadores que en el futuro hagan estudios sobre tasa de preñez en programas de TE y busquen estandarizar procedimientos o animales base para el estudio, como para profesionales y/o empresas que ofrezcan comercialmente la técnica y busquen eficiencia en sus procedimientos, con el fin de difundir esta técnica. o simplemente mejorar sus resultados.

Es muy Importante evitar las receptoras que presenten problemas al momento de la transferencia para esto se podría realizar una visita previa a comenzar el proceso de la transferencia de los embriones, en la cual se clasifiquen las receptoras y se identifiquen posibles problemas que puedan presentar inconvenientes en la transferencia como cuellos defectuosos, úteros de tamaño grande o úteros de ubicación abdominal.. De Igual manera se debe hacer un análisis de las instalaciones para identificar posibles problemas de locación que dificulte el normal desarrollo de la transferencia.

Es también de alta importancia transferir los embriones lo mas rápido después de la salida de los embriones del laboratorio de producción, en lo posible dentro de las primeras 5 horas. Para esto de debe contar con una planeación de los programas en la fase inicial de los estudios que busque optimizar en procesos como transporte y traslado al momento de la transferencia para evitar al máximo contratiempos que prolonguen el tiempo transcurrido entre la entrega de los embriones y la transferencia y así buscar la mayor eficiencia en este aspecto. En los programas de TE comerciales es importante tener personal que se dedique a este tipo de aspectos ya que una de las ventajas de la técnica es la rapidez con la que se pueden realizar los trabajos, por lo tanto cuando el volumen de trabajos es alto se requiere de este tipo de personal en la empresa. o en casos especiales contratar este tipo de servicio a empresas especializadas en el tema.

Dado que la calidad del embrión esta relacionada con la tasa de preñez, se hace evidente que los laboratorios de PIV deben hacer una clasificación estricta de los

embriones enviados a transferencia. En este trabajo la clasificación de referencia IETS 1 (excelente o bueno) fue dividida en dos subcategorías: Excelentes y buenos, encontrando relación entre esta clasificación y la tasa de preñez haciendo evidente que para embriones PIV la clasificación podría ser diferente.

Las personas que clasifican los embriones durante el proceso PIV deben tener esto en cuenta para asegurar resultados estables ya sea en programas de transferencia de embriones comerciales o en estudios de investigación.

Es también recomendable realizar evaluaciones y re-entrenamiento constante con los técnicos que transfieren los embriones para que tengan mayor cuidado en la transferencia de cantidades considerables de embriones, transfiriendo con calma todos los embriones y ver la posibilidad de tomar tiempos de receso si están cansados. Esto para evitar la baja en las tasa de preñez especialmente después del embrión número 40 transferido y analizar la posibilidad de utilizar más de un técnico cuando se transfieran cantidades considerables de embriones.

Con el fin de enfrentar la posible baja en las tasas de preñez con relación a la época del año comprendida entre diciembre y marzo, se recomienda adoptar estrategias como: programar recopilación de datos de estudios en los meses de mejores resultados de tasa de preñez, y/o tener en cuenta que puede haber variaciones respecto a la época del año en la que se desarrolle el estudio. En los trabajos comerciales, se debe tener en cuenta la época de baja producción para trabajar con clientes con buenos índices en sus programas y que en lo posible la transferencia de los embriones tenga un tiempo de transporte corto, todo esto para evitar al máximo una disminución drástica de la cantidad de preñeces producidas.

Se recomienda hacer estudios sobre la estacionalidad del ganado bovino en el trópico y sus posibles influencias en las diferentes biotecnologías reproductivas. Es importante incluir en estos estudios todo el ciclo de la PIV, desde la OPU hasta la transferencia para detectar variables pre-PIV que podrían afectar la preñez como la calidad del oocito, problemas referentes a la producción como tiempos de maduración entre muchos otros, y los problemas ya analizados en este trabajo teniendo en cuenta aumentar el número de datos.

Escoger un toro que sea probado con buenas producciones y tasas de preñez cuando se planea un estudio es recomendable para eliminar ese factor de influencia en los resultados, comercialmente se debe sugerir al cliente el uso de toros con índices altos de preñez en PIV, así como de informarle cuando use toros de bajo índice, con el fin evitar decepciones con trabajos de pocas preñeces.

BIBLIOGRAFIA

Al-Katanani Y.M., Drost M., Monson R.L., Rutledge J.J., Krininger III C.E., Blockb J., Thatcher W.W., Hansena P.J. 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

Asocebu, Asociación Colombiana de Criadores de Ganado Cebú. Departamento de Registros. Informe de animales registrados Enero a Diciembre 2007 y Enero a 16 de Diciembre 2008. 2008.

Barcelo´-Fimbres M., Brink Z., Seidel G.E.Jr Effects of phenazine ethosulfate during culture of bovine embryos on pregnancy rate, prenatal and postnatal development. *Theriogenology* 2009, 71: 355–368

Baruselli PS, Nasser LF, Reis EL, Oliveira MA, Bo GA,. Comparison of four synchronization protocols for fixed time embryo transfer in *Bos indicus* x *Bos Taurus* recipients. *Theriogenology* 2004, 62(9): 1577-84.

Binelli M, Thatcher WW, Mattos R, Baruselli PS.. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 2001, 56 (9): 1451-63.

Block J., Bonilla L., Hansen. P.J. 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.

Block J., Fischer-Brown A.E., Rodina T.M., Ealy A.D., Hansen P.J. The effect of in vitro treatment of bovine embryos with IGF-1 on subsequent development in utero to Day 14 of gestation. *Theriogenology* 2007, 68: 153–161

Block J. y Hansen P.J. 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

Blondin P., Beaulieu M., Fournier V., Morin N., Crawford L., Madan P., King W.A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology* 2009, 71: 30–38

Brackett BG y Oliphant G.. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod.* 1975, 12(2):260-74

Callesen H., Lovendahl P., Bak and Greve T. Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. *J Anim Sci*, 1995, 73:1539-1543.

Chebel R.C., Deme'trio D.G.B., Metzger J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology* 2008, 69: 98–106

Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod.* 2001, 64(5):1375-85

Díaz AP., García ML. Evaluación de factores que afectan la producción y viabilidad de alguna razas cebuinas en Colombia. Tesis de Grado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnica. Universidad Nacional de Colombia. 1999

Fernandes C.E., Dode M.A.N., Pereira D. , Silva A.E.D.F. 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

Franco M., Thompson P.M., Brad A.M., Hansen P.J. 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* 2006a; 66(4):945-54

Franco M., Block J., Jousan F.D., de Castro e Paula L.A., Brad A.M., Franco J.M., Grisel F., Monson R.L., Rutledge J.J., Hansen P.J. Effect of transfer of one or two in vitro-produced embryos and post-transfer administration of gonadotropin releasing hormone on pregnancy rates of heat-stressed dairy cattle. *Theriogenology* 2006b, 66: 224–233

Freret S, Grimard B, Ponter AA, Joly C, Ponsart C, Humblot P. Reduction of body-weight gain enhances in vitro embryo production in overfed superovulated dairy heifers. *Reproduction*. 2006, 131(4):783-94

Garcia-bojalil CM., Staples CR. Thatcher WW. And Drost . Protein Intake and Development of Ovarian Follicles and Embryos of Superovulated Nonlactating Dairy Cows. *J Anim Sci*. 1988, 66(6):1508-19.

Giesen J. Daylight Applet/Tageslicht-Applet. In <http://www.jgiesen.de/daylight/>

Hasler John. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 2001, 56:1401-1415

Ideta A, Hayama K, Urakawa M, Jung YG, Lim KT, Lee WY, Song HB, Aoyagi Y. Relationships among estrous behavior, superovulatory response and grade 1 embryo sex ratio in superovulated Holstein heifers. *J Reprod Dev.* 2007, 53(5):1015-21.

IDEAM. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, Colombia. Sistema de información nacional ambiental. Estación 2120109 Viota, Estación 3521501 Apto Yopal y Estación 2904502 Apto E Cortissoz. 2009

IETS. Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. Tercera Edición. Jun 2000, 109 -123.

Kafi M, McGowan M. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science.* 1997, 48: 137- 157

Knijn HM, Wrenzycki C, Hendriksen PJ, Vos PL, Herrmann D, van der Weijden GC, Niemann H, Dieleman SJ. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. *Reproduction.* 2002, 124(3):365-75

King, WA. Embryo-mediated pregnancy failure in cattle. *Can Vet J.* 1991, 32: 99-103.

Kruij ThA. and den Daas JHG. In Vitro Produced And Cloned Embryos :Effects On Pregnancy, Parturition And Offspring. *Theriogenology* 1997, 47:43-52.

Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruij T, Niemann H, Galli C. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod.* 2002, 67(3):767-75.

Lonergan P., Khatir H., Piumi F., Rieger D., Humblot P. and Boland M. P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos *Journal of Reproduction and Fertility*. 1999, 117: 159-167

Looney CR, Nelson JS, Schneider HJ, Forrest DW. Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology* 2006, 65(1):201-9.

Malhi P, Adams G P, Mapletoft R J Singh J. Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging. *Reproduction*. 2007, 134: 233–239

McMillan WH, Donnison MJ. Understanding maternal contributions to fertility in recipient cattle: development of herds with contrasting pregnancy rates. *Anim Reprod Sci*. 1999, 15;57(3-4):127-40

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

Palma GA. *Biología de la Reproducción*. Ediciones INTA, Primera Edición. Argentina 2001. 225-282

Peterson AJ, Lee RS. Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology* 2003, 59:607-697.

Pontes JHF., Nonato-Junior I., Sanches BV., Ereno-Junior JC., Uvo S., Barreiros TRR., Oliveira JA., Hasler JF., Seneda MM. Comparison of embryo yield and pregnancy rate

between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 2008, 71: 690–697

Rico C, Fabre S, Médigue C, di Clemente N, Clément F, Bontoux M, Touzé JL, Dupont M, Briant E, Rémy B, Beckers JF, Monniaux D. Anti-Mullerian Hormone Is an Endocrine Marker of Ovarian Gonadotropin-Responsive Follicles and Can Help to Predict Superovulatory Responses in the Cow. *Biol Reprod.* 2008,DOI:10.1095

Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-García R, Pintado B, de la Fuente J, Gutiérrez-Adán A. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod.* 2002, 66(3):589-95

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 and other Lipid Mediators* 2005, 78(1-4):38-45.

Shah K D, 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. *Journal of Reproduction and Development.* 2007, 53(6): 1237-46

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.

Thatcher WW., Moreira,F., Santos JEP, Mattos RC., Lopes FL., Pancarciland SM., Risco CA. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 2001, 55:75-89.

Thibier M. A contrasted year for the world activity of the animal embryo transfer industry. A report from the IETS Data Retrieval Committee. 2002. in <http://www.iets.org>

----- . Data Retrieval Committee Annual Report. More than half a million bovine embryos transferred in 2002. A report from the IETS Data Retrieval Committee. 2003 in <http://www.iets.org>.

----- . Data Retrieval Committee Annual Report. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world. 2004, in <http://www.iets.org>

----- . Data Retrieval Committee Annual Report - Year 2004. Significant increases in transfers of both in vivo derived and in vitro produced embryos in cattle and contrasted trends in other species in 2004. 2005a, in <http://www.iets.org>

----- . The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod. Nutr. Dev.* 2005b, 45: 235–242

----- . Transfers of both in vivo derived and in vitro produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. Data Retrieval Committee Annual Report. *IETS Newsletter*, 2006, 24, (4)

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.

Vélez G. Selección de la Vaca Receptora Para Transferencia de Embriones en Colombia. Primera edición. Doble clic Sistemas y suministros. Bogotá Colombia, 2003.

Xu J., Chaubal SA., Du F. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology* 2009, 71: 39–47.

Zemjanis. R. Reproducción animal: diagnóstico y técnicas terapéuticas. Noriega Editores. México 1996. p 73.

Anexo B.

Análisis estadístico Univariado

UNIVARIATE ANALYSIS

Crosstabs

Notes

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Prenadas * Calidad del embrión	1227	100.0%	0	.0%	1227	100.0%
Prenadas * Diametro del cuerpo luteo	1227	100.0%	0	.0%	1227	100.0%
Prenadas * Dificultad	1227	100.0%	0	.0%	1227	100.0%
Prenadas * Numero de transferencias	1227	100.0%	0	.0%	1227	100.0%
Prenadas * Tiempo entre el laboratorio y la transferencia	1227	100.0%	0	.0%	1227	100.0%
Prenadas * Numero consecutivo de embriones transferidos	1227	100.0%	0	.0%	1227	100.0%
Prenadas * Cuerno en que se trasfirió	1227	100.0%	0	.0%	1227	100.0%
Prenadas * Experiencia del Técnico	1227	100.0%	0	.0%	1227	100.0%
Prenadas * Razas del embrión	1227	100.0%	0	.0%	1227	100.0%
Prenadas * Toros	1227	100.0%	0	.0%	1227	100.0%
Prenadas * Cuatrimestre	1227	100.0%	0	.0%	1227	100.0%
Prenadas * Técnico	1227	100.0%	0	.0%	1227	100.0%
Prenadas * Central	1227	100.0%	0	.0%	1227	100.0%
Prenadas * Diametro del cuerpo Luteo	1227	100.0%	0	.0%	1227	100.0%
Prenadas * Procedencia del semen	1227	100.0%	0	.0%	1227	100.0%

Prenadas * Calidad del embrión

Crosstab

Prenadas	Vacías	Count	Calidad del embrión		Total
			Excelente	Bueno	
			685	80	765
		Expected Count	702	63	765.0
		% within Prenadas	89.5%	10.5%	100.0%
		% within Calidad del embrión	60.8%	79.2%	62.3%
		% of Total	55.8%	6.5%	62.3%

Prenadas	Count			462
		441	21	
	Expected Count			462.0
		424.0	38.0	
	% within Prenadas			100.0%
		95.5%	4.5%	
	% within Calidad del embrion			37.7%
		39.2%	20.8%	
	% of Total			37.7%
		35.9%	1.7%	
Total	Count			1227
		1126	101	
	Expected Count			1227.0
		1126.0	101.0	
	% within Prenadas			100.0%
		91.8%	8.2%	
	% within Calidad del embrion			100.0%
		100.0%	100.0%	
	% of Total			100.0%
		91.8%	8.2%	

Chi-Square Tests

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	13.328(b)	1	.000		
Continuity Correction(a)	12.557	1	.000		
Likelihood Ratio	14.448	1	.000		
Fisher's Exact Test				.000	.000
Linear-by-Linear Association	13.317	1	.000		
N of Valid Cases	1227				

a Computed only for a 2x2 table

b 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 38.03.

Risk Estimate (ODDS RATIO)

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Prenadas (Vacías / Prenadas)	.408	.248	.669
For cohort Calidad del embrion = Excelente	.938	.909	.968
For cohort Calidad del embrion = Bueno	2.301	1.443	3.668
N of Valid Cases	1227		

Tests of Homogeneity of the Odds Ratio

	Chi-Squared	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Breslow-Day	.000	0	.
Tarone's	.000	0	.

Tests of Conditional Independence

	Chi-Squared	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Cochran's	13.328	1	.000
Mantel-Haenszel	12.547	1	.000

Under the conditional independence assumption, Cochran's statistic is asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution, only if the number of strata is fixed, while the Mantel-Haenszel statistic is always asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution. Note that the continuity correction is removed from the Mantel-Haenszel statistic when the sum of the differences between the observed and the expected is 0.

Prenadas * Diametro del cuerpo luteo

		Crosstab			Total	
		Diametro del cuerpo luteo				
		< 10 mm	10-15 mm	> 15 mm	< 10 mm	
Prenadas	Vacias	Count	96	351	318	765
		Expected Count				765.0
			82.9	357.9	324.2	
		% within Prenadas				100.0%
			12.5%	45.9%	41.6%	
		% within Diametro del cuerpo luteo				62.3%
			72.2%	61.1%	61.2%	
		% of Total				62.3%
			7.8%	28.6%	25.9%	
	Prenadas	Count	37	223	202	462
		Expected Count				462.0
			50.1	216.1	195.8	
		% within Prenadas				100.0%
			8.0%	48.3%	43.7%	
		% within Diametro del cuerpo luteo				37.7%
			27.8%	38.9%	38.8%	
		% of Total				37.7%
			3.0%	18.2%	16.5%	
Total		Count	133	574	520	1227
		Expected Count				1227.0
			133.0	574.0	520.0	
		% within Prenadas				100.0%
			10.8%	46.8%	42.4%	
		% within Diametro del cuerpo luteo				100.0%
			100.0%	100.0%	100.0%	
		% of Total				100.0%
			10.8%	46.8%	42.4%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6.144(a)	2	.046
Likelihood Ratio	6.384	2	.041
Linear-by-Linear	2.981	1	.084
Association			
N of Valid Cases	1227		

a 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 50.08.

Risk Estimate

Value
Odds Ratio for Prenadas (Vacias / Prenadas)
(a)

a Risk Estimate statistics cannot be computed. They are only computed for a 2*2 table without empty cells.

Prenadas * Dificultad

Crosstab

		Dificultad		Total
		No	Si	No
Prenadas	Vacias	Count		765
		695	70	
		Expected Count		765.0
		715.7	49.3	
		% within Prenadas		100.0%
		90.8%	9.2%	
		% within Dificultad		62.3%
		60.5%	88.6%	
		% of Total		62.3%
		56.6%	5.7%	
	Prenadas	Count		462
		453	9	
		Expected Count		462.0
		432.3	29.7	
		% within Prenadas		100.0%
		98.1%	1.9%	
		% within Dificultad		37.7%
		39.5%	11.4%	
		% of Total		37.7%
		36.9%	.7%	
Total		Count		1227
		1148	79	
		Expected Count		1227.0
		1148.0	79.0	
		% within Prenadas		100.0%
		93.6%	6.4%	

% within Dificultad			100.0%
	100.0%	100.0%	
% of Total	93.6%	6.4%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	24.804(b)	1	.000		
Continuity Correction(a)	23.623	1	.000		
Likelihood Ratio	29.279	1	.000		
Fisher's Exact Test				.000	.000
Linear-by-Linear Association	24.784	1	.000		
N of Valid Cases	1227				

a Computed only for a 2x2 table

b 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 29.75.

Risk Estimate ODDS RATIO

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Prenadas (Vacías / Prenadas)	.197	.098	.399
For cohort Dificultad = No	.927	.903	.951
For cohort Dificultad = Si	4.697	2.369	9.312
N of Valid Cases	1227		

Tests of Homogeneity of the Odds Ratio

	Chi-Squared	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Breslow-Day	.000	0	.
Tarone's	.000	0	.

Tests of Conditional Independence

	Chi-Squared	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Cochran's	24.804	1	.000
Mantel-Haenszel	23.603	1	.000

Under the conditional independence assumption, Cochran's statistic is asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution, only if the number of strata is fixed, while the Mantel-Haenszel statistic is always asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution. Note that the continuity correction is removed from the Mantel-Haenszel statistic when the sum of the differences between the observed and the expected is 0.

Prenadas * Numero de trasferencias

Crosstab

			Numero de trasferencias			Total
			Primera transferencia	Dos Transferencias	Tres o mas transferencias	Primera transferencia
Prenadas	Vacias	Count	476	184	105	765
		Expected Count	485.1	182.1	97.9	765.0

	% within Prenadas	62.2%	24.1%	13.7%	100.0%
	% within Numero de transferencias	61.2%	63.0%	66.9%	62.3%
	% of Total	38.8%	15.0%	8.6%	62.3%
Prenadas	Count	302	108	52	462
	Expected Count	292.9	109.9	59.1	462.0
	% within Prenadas	65.4%	23.4%	11.3%	100.0%
	% within Numero de transferencias	38.8%	37.0%	33.1%	37.7%
	% of Total	24.6%	8.8%	4.2%	37.7%
Total	Count	778	292	157	1227
	Expected Count	778.0	292.0	157.0	1227.0
	% within Prenadas	63.4%	23.8%	12.8%	100.0%
	% within Numero de transferencias	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total	63.4%	23.8%	12.8%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.878(a)	2	.391
Likelihood Ratio	1.901	2	.387
Linear-by-Linear Association	1.794	1	.180
N of Valid Cases	1227		

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 59.11.

Risk Estimate

Value
Odds Ratio for Prenadas (Vacías / Prenadas)
(a)

a. Risk Estimate statistics cannot be computed. They are only computed for a 2*2 table without empty cells.

Prenadas * Tiempo entre el laboratorio y la transferencia

Crosstab

	Total	
Tiempo entre el laboratorio y la transferencia	< 5 horas	> 5 horas
< 5 horas		
> 5 horas		

Prenadas	Vacias	Count			765
			380	385	
		Expected Count			765.0
			405.9	359.1	
		% within Prenadas			100.0%
			49.7%	50.3%	
		% within Tiempo entre el laboratorio y la transferencia			62.3%
			58.4%	66.8%	
		% of Total			62.3%
			31.0%	31.4%	
	Prenadas	Count			462
			271	191	
		Expected Count			462.0
			245.1	216.9	
		% within Prenadas			100.0%
			58.7%	41.3%	
		% within Tiempo entre el laboratorio y la transferencia			37.7%
			41.6%	33.2%	
		% of Total			37.7%
			22.1%	15.6%	
Total		Count			1227
			651	576	
		Expected Count			1227.0
			651.0	576.0	
		% within Prenadas			100.0%
			53.1%	46.9%	
		% within Tiempo entre el laboratorio y la transferencia			100.0%
			100.0%	100.0%	
		% of Total			100.0%
			53.1%	46.9%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	9.336(b)	1	.002		
Continuity Correction(a)	8.979	1	.003		
Likelihood Ratio	9.368	1	.002		
Fisher's Exact Test				.003	.001
Linear-by-Linear Association	9.328	1	.002		
N of Valid Cases	1227				

a Computed only for a 2x2 table

b 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 216.88.

Risk Estimate

95% Confidence Interval			
Value	Upper	Lower	
Lower			

Odds Ratio for Prenadas (Vacías / Prenadas)	.696	.551	.878
For cohort Tiempo entre el laboratorio y la transferencia = < 5 horas	.847	.763	.940
For cohort Tiempo entre el laboratorio y la transferencia = > 5 horas	1.217	1.070	1.386
N of Valid Cases	1227		

Tests of Homogeneity of the Odds Ratio

	Chi-Squared	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Breslow-Day	.000	0	.
Tarone's	.000	0	.

Tests of Conditional Independence

	Chi-Squared	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Cochran's	9.336	1	.002
Mantel-Haenszel	8.971	1	.003

Under the conditional independence assumption, Cochran's statistic is asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution, only if the number of strata is fixed, while the Mantel-Haenszel statistic is always asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution. Note that the continuity correction is removed from the Mantel-Haenszel statistic when the sum of the differences between the observed and the expected is 0.

**Prenadas * Numero consecutivo de embriones trasferidos
Crosstab**

Prenadas	Vacías	Count	Numero consecutivo de embriones trasferidos		Total
			1-30 Embriones trasferidos	31-60 Embriones trasferidos	1-30 Embriones trasferidos
			621	144	765
		Expected Count	634.1	130.9	765.0
		% within Prenadas	81.2%	18.8%	100.0%
		% within Numero consecutivo de embriones trasferidos	61.1%	68.6%	62.3%
		% of Total	50.6%	11.7%	62.3%
	Prenadas	Count	396	66	462
		Expected Count	382.9	79.1	462.0
		% within Prenadas	85.7%	14.3%	100.0%
		% within Numero consecutivo de embriones trasferidos	38.9%	31.4%	37.7%

	% of Total		32.3%	5.4%	37.7%
Total	Count		1017	210	1227
	Expected Count		1017.0	210.0	1227.0
	% within Prenadas		82.9%	17.1%	100.0%
	% within Numero consecutivo de embriones transferidos		100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total		82.9%	17.1%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	4.181(b)	1	.041		
Continuity Correction(a)	3.867	1	.049		
Likelihood Ratio	4.267	1	.039		
Fisher's Exact Test				.042	.024
Linear-by-Linear Association	4.178	1	.041		
N of Valid Cases	1227				

a Computed only for a 2x2 table

b 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 79.07.

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
	Lower	Upper	Lower
Odds Ratio for Prenadas (Vacias / Prenadas)	.719	.523	.987
For cohort Numero consecutivo de embriones transferidos = 1-30 Embriones transferidos	.947	.900	.996
For cohort Numero consecutivo de embriones transferidos = 31-60 Embriones transferidos	1.318	1.008	1.722
N of Valid Cases	1227		

Tests of Homogeneity of the Odds Ratio

	Chi-Squared	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Breslow-Day	.000	0	.
Tarone's	.000	0	.

Tests of Conditional Independence

	Chi-Squared	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Cochran's	4.181	1	.041
Mantel-Haenszel	3.864	1	.049

Under the conditional independence assumption, Cochran's statistic is asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution, only if the number of strata is fixed, while the Mantel-Haenszel statistic is always asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution. Note that the continuity correction is removed from the Mantel-Haenszel statistic when the sum of the differences between the observed and the expected is 0.

Prenadas * Cuerno en que se trasfirió

Crosstab

		Cuerno en que se traslado		Total	
		Cuerno Derecho	Cuerno Izquierdo	Cuerno Derecho	
Prenadas	Vacias	Count	464	301	765
		Expected Count	465.1	299.9	765.0
		% within Prenadas	60.7%	39.3%	100.0%
		% within Cuerno en que se traslado	62.2%	62.6%	62.3%
		% of Total	37.8%	24.5%	62.3%
	Prenadas	Count	282	180	462
		Expected Count	280.9	181.1	462.0
		% within Prenadas	61.0%	39.0%	100.0%
		% within Cuerno en que se traslado	37.8%	37.4%	37.7%
		% of Total	23.0%	14.7%	37.7%
Total		Count	746	481	1227
		Expected Count	746.0	481.0	1227.0
		% within Prenadas	60.8%	39.2%	100.0%
		% within Cuerno en que se traslado	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	60.8%	39.2%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.018(b)	1	.893		
Continuity Correction(a)	.005	1	.941		
Likelihood Ratio	.018	1	.893		
Fisher's Exact Test				.904	.471
Linear-by-Linear Association	.018	1	.893		
N of Valid Cases	1227				

a Computed only for a 2x2 table

b 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 181.11.

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Prenadas (Vacias / Prenadas)	.984	.777	1.247
For cohort Cuerno en que se trasfrio = Cuerno Derecho	.994	.906	1.090
For cohort Cuerno en que se trasfrio = Cuerno Izquierdo	1.010	.874	1.166
N of Valid Cases	1227		

Tests of Homogeneity of the Odds Ratio			
	Chi-Squared	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Breslow-Day	.000	0	.
Tarone's	.000	0	.

Tests of Conditional Independence			
	Chi-Squared	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Cochran's	.018	1	.893
Mantel-Haenszel	.005	1	.941

Under the conditional independence assumption, Cochran's statistic is asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution, only if the number of strata is fixed, while the Mantel-Haenszel statistic is always asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution. Note that the continuity correction is removed from the Mantel-Haenszel statistic when the sum of the differences between the observed and the expected is 0.

Prenadas * Experiencia del Tecnico

		Crosstab		Total	
		Experiencia del Tecnico			
		Experimentado	Novato	Experimentado	
Prenadas	Vacias	Count	698	67	765
		Expected Count	705.8	59.2	765.0
		% within Prenadas	91.2%	8.8%	100.0%
		% within Experiencia del Tecnico	61.7%	70.5%	62.3%
		% of Total	56.9%	5.5%	62.3%
	Prenadas	Count	434	28	462
		Expected Count	426.2	35.8	462.0
		% within Prenadas	93.9%	6.1%	100.0%
		% within Experiencia del Tecnico	38.3%	29.5%	37.7%

Prenadas	Vacias	Count	Brahman			Brahman 765
			Brahman Rojo	Gyr	Brahman	
		Count	671	35	59	
		Expected Count	665.2	34.3	65.5	765.0
		% within Prenadas	87.7%	4.6%	7.7%	100.0%
		% within Razas del embrion	62.9%	63.6%	56.2%	62.3%
		% of Total	54.7%	2.9%	4.8%	62.3%
	Prenadas	Count	396	20	46	462
		Expected Count	401.8	20.7	39.5	462.0
		% within Prenadas	85.7%	4.3%	10.0%	100.0%
		% within Razas del embrion	37.1%	36.4%	43.8%	37.7%
		% of Total	32.3%	1.6%	3.7%	37.7%
Total		Count	1067	55	105	1227
		Expected Count	1067.0	55.0	105.0	1227.0
		% within Prenadas	87.0%	4.5%	8.6%	100.0%
		% within Razas del embrion	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	87.0%	4.5%	8.6%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.867(a)	2	.393
Likelihood Ratio	1.836	2	.399
Linear-by-Linear Association	1.521	1	.217
N of Valid Cases	1227		

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 20.71.

Risk Estimate

Value
Odds Ratio for Prenadas (Vacias / Prenadas) (a)

a. Risk Estimate statistics cannot be computed. They are only computed for a 2*2 table without empty cells.

Prenadas * Toros

Crosstab

		Toros													Total
		Sansao Sexado													Sansao Sexado
Prenadas	Vacias	Count	005	19-6	237-1	309-1	449-0	49-8	616-6	800	847-5	867-2	Marcante	Otros	76:
		Count	37	46	44	90	40	24	33	34	66	28	48	20	255
		Expected Count	34.3	48.6	43.6	87.3	40.5	29.3	24.3	35.5	58.0	32.4	60.5	21.8	248.8
		% within Prenadas	4.8%	6.0%	5.8%	11.8%	5.2%	3.1%	4.3%	4.4%	8.6%	3.7%	6.3%	2.6%	33.3%
		% within Toros	67.3%	59.0%	62.9%	64.3%	61.5%	51.1%	84.6%	59.6%	71.0%	53.8%	49.5%	57.1%	63.9%
		% of Total	3.0%	3.7%	3.6%	7.3%	3.3%	2.0%	2.7%	2.8%	5.4%	2.3%	3.9%	1.6%	20.8%
	Prenadas	Count	18	32	26	50	25	23	6	23	27	24	49	15	144
		Expected Count	20.7	29.4	26.4	52.7	24.5	17.7	14.7	21.5	35.0	19.6	36.5	13.2	150.2
		% within Prenadas	3.9%	6.9%	5.6%	10.8%	5.4%	5.0%	1.3%	5.0%	5.8%	5.2%	10.6%	3.2%	31.2%
		% within Toros	32.7%	41.0%	37.1%	35.7%	38.5%	48.9%	15.4%	40.4%	29.0%	46.2%	50.5%	42.9%	36.1%
		% of Total	1.5%	2.6%	2.1%	4.1%	2.0%	1.9%	.5%	1.9%	2.2%	2.0%	4.0%	1.2%	11.7%
Total		Count	55	78	70	140	65	47	39	57	93	52	97	35	399
		Expected Count	55.0	78.0	70.0	140.0	65.0	47.0	39.0	57.0	93.0	52.0	97.0	35.0	399.0
		% within Prenadas	4.5%	6.4%	5.7%	11.4%	5.3%	3.8%	3.2%	4.6%	7.6%	4.2%	7.9%	2.9%	32.5%
		% within Toros	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	4.5%	6.4%	5.7%	11.4%	5.3%	3.8%	3.2%	4.6%	7.6%	4.2%	7.9%	2.9%	32.5%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	24.360(a)	12	.018
Likelihood Ratio	25.320	12	.013
Linear-by-Linear Association	.139	1	.709
N of Valid Cases	1227		

a 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 13.18.

Risk Estimate

	Value
Odds Ratio for Prenadas	(a)

(Vacías / Prenadas)

a Risk Estimate statistics cannot be computed. They are only computed for a 2*2 table without empty cells.

Prenadas * Cuatrimestre

Crosstab

			Cuatrimestre			Total
			Diciembre, Enero, Febrero y Marzo	Abril, Mayo, Junio y Julio	Agosto, Septiembre, Octubre y Noviembre	Diciembre, Enero, Febrero y Marzo
Prenadas	Vacías	Count	224	305	236	765
		Expected Count	229.4	320.5	215.1	765.0
		% within Prenadas	29.3%	39.9%	30.8%	100.0%
		% within Cuatrimestre	60.9%	59.3%	68.4%	62.3%
		% of Total	18.3%	24.9%	19.2%	62.3%
	Prenadas	Count	144	209	109	462
		Expected Count	138.6	193.5	129.9	462.0
		% within Prenadas	31.2%	45.2%	23.6%	100.0%
		% within Cuatrimestre	39.1%	40.7%	31.6%	37.7%
		% of Total	11.7%	17.0%	8.9%	37.7%
Total		Count	368	514	345	1227
		Expected Count	368.0	514.0	345.0	1227.0
		% within Prenadas	30.0%	41.9%	28.1%	100.0%
		% within Cuatrimestre	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	30.0%	41.9%	28.1%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	7.719(a)	2	.021
Likelihood Ratio	7.831	2	.020
Linear-by-Linear Association	4.144	1	.042
N of Valid Cases	1227		

a 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 129.90.

Risk Estimate	
Value	
Odds Ratio for Prenadas (Vacias / Prenadas)	(a)

a Risk Estimate statistics cannot be computed. They are only computed for a 2*2 table without empty cells.

Prenadas * Tecnico

			Crosstab					Total
			Tecnico					
			Tecnico 1	Tecnico 2	Tecnico 3	Tecnico 4	Tecnico 5	Tecnico 1
Prenadas	Vacias	Count						765
		Count	119	530	49	48	19	
		Expected Count	119.1	526.8	59.9	43.6	15.6	765.0
		% within Prenadas	15.6%	69.3%	6.4%	6.3%	2.5%	100.0%
		% within Tecnico	62.3%	62.7%	51.0%	68.6%	76.0%	62.3%
		% of Total	9.7%	43.2%	4.0%	3.9%	1.5%	62.3%
	Prenadas	Count	72	315	47	22	6	462
		Expected Count	71.9	318.2	36.1	26.4	9.4	462.0
		% within Prenadas	15.6%	68.2%	10.2%	4.8%	1.3%	100.0%
		% within Tecnico	37.7%	37.3%	49.0%	31.4%	24.0%	37.7%
		% of Total	5.9%	25.7%	3.8%	1.8%	.5%	37.7%
Total		Count	191	845	96	70	25	1227
		Expected Count	191.0	845.0	96.0	70.0	25.0	1227.0
		% within Prenadas	15.6%	68.9%	7.8%	5.7%	2.0%	100.0%
		% within Tecnico	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	15.6%	68.9%	7.8%	5.7%	2.0%	100.0%

Chi-Square Tests		
Value	df	Asymp. Sig. (2-

Pearson Chi-Square	8.418(a)	4	.077
Likelihood Ratio	8.429	4	.077
Linear-by-Linear Association	.365	1	.546
N of Valid Cases	1227		

a 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9.41.

Risk Estimate	
Value	
Odds Ratio for Prenadas (Vacias / Prenadas)	(a)

a Risk Estimate statistics cannot be computed. They are only computed for a 2*2 table without empty cells.

Prenadas * Central

			Crosstab			Total
			Central			
			Central 1	Central 2	Central 3	Central 1
Prenadas	Vacias	Count	373	166	226	765
		Expected Count	384.1	178.3	202.6	765.0
		% within Prenadas	48.8%	21.7%	29.5%	100.0%
		% within Central	60.6%	58.0%	69.5%	62.3%
		% of Total	30.4%	13.5%	18.4%	62.3%
	Prenadas	Count	243	120	99	462
		Expected Count	231.9	107.7	122.4	462.0
		% within Prenadas	52.6%	26.0%	21.4%	100.0%
		% within Central	39.4%	42.0%	30.5%	37.7%
		% of Total	19.8%	9.8%	8.1%	37.7%
Total		Count	616	286	325	1227
		Expected Count	616.0	286.0	325.0	1227.0
		% within Prenadas	50.2%	23.3%	26.5%	100.0%
		% within Central	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	50.2%	23.3%	26.5%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	10.263(a)	2	.006
Likelihood Ratio	10.444	2	.005
Linear-by-Linear Association	5.786	1	.016
N of Valid Cases	1227		

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 107.69.

Risk Estimate

Value
Odds Ratio for Prenadas (Vacias / Prenadas) (a)

a. Risk Estimate statistics cannot be computed. They are only computed for a 2*2 table without empty cells.

Prenadas * Diametro del cuerpo Luteo

Crosstab

			Diametro del cuerpo Luteo		Total
			< 15 mm	> 15 mm	< 15 mm
Prenadas	Vacias	Count	447	318	765
		Expected Count	440.8	324.2	765.0
		% within Prenadas	58.4%	41.6%	100.0%
		% within Diametro del cuerpo Luteo	63.2%	61.2%	62.3%
		% of Total	36.4%	25.9%	62.3%
	Prenadas	Count	260	202	462
		Expected Count	266.2	195.8	462.0
		% within Prenadas	56.3%	43.7%	100.0%
		% within Diametro del cuerpo Luteo	36.8%	38.8%	37.7%
		% of Total	21.2%	16.5%	37.7%
Total		Count	707	520	1227
		Expected Count	707.0	520.0	1227.0
		% within Prenadas	57.6%	42.4%	100.0%

% within Diametro del cuerpo Luteo	100.0%	100.0%	100.0%
% of Total	57.6%	42.4%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.547(b)	1	.459		
Continuity Correction(a)	.463	1	.496		
Likelihood Ratio	.547	1	.460		
Fisher's Exact Test				.475	.248
Linear-by-Linear Association	.547	1	.460		
N of Valid Cases	1227				

a Computed only for a 2x2 table

b 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 195.79.

Risk Estimate

	95% Confidence Interval		
	Value	Upper	Lower
Odds Ratio for Prenadas (Vacias / Prenadas)	1.092	.865	1.379
For cohort Diametro del cuerpo Luteo = < 15 mm	1.038	.939	1.148
For cohort Diametro del cuerpo Luteo = > 15 mm	.951	.832	1.086
N of Valid Cases	1227		

Tests of Homogeneity of the Odds Ratio

	Chi-Squared	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Breslow-Day	.000	0	.
Tarone's	.000	0	.

Tests of Conditional Independence

	Chi-Squared	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Cochran's	.547	1	.459
Mantel-Haenszel	.462	1	.497

Under the conditional independence assumption, Cochran's statistic is asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution, only if the number of strata is fixed, while the Mantel-Haenszel statistic is always asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution. Note that the continuity correction is removed from the Mantel-Haenszel statistic when the sum of the differences between the observed and the expected is 0.

Prenadas * Procedencia del semen

Crosstab

Prenadas	Vacias	Count	Procedencia del semen		Total
			Semen Importado	Semen Nacional	Semen Importado
			579	186	765
		Expected Count	556.8	208.2	765.0

	% within Prenadas	75.7%	24.3%	100.0%
	% within Procedencia del semen	64.8%	55.7%	62.3%
	% of Total	47.2%	15.2%	62.3%
Prenadas	Count	314	148	462
	Expected Count	336.2	125.8	462.0
	% within Prenadas	68.0%	32.0%	100.0%
	% within Procedencia del semen	35.2%	44.3%	37.7%
	% of Total	25.6%	12.1%	37.7%
<u>Total</u>	Count	893	334	1227
	Expected Count	893.0	334.0	1227.0
	% within Prenadas	72.8%	27.2%	100.0%
	% within Procedencia del semen	100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total	72.8%	27.2%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	8.667(b)	1	.003		
Continuity Correction(a)	8.282	1	.004		
Likelihood Ratio	8.565	1	.003		
Fisher's Exact Test				.004	.002
Linear-by-Linear Association	8.660	1	.003		
N of Valid Cases	1227				

a Computed only for a 2x2 table

b 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 125.76.

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Upper	Lower
Odds Ratio for Prenadas (Vacias / Prenadas)	1.467	1.136	1.895
For cohort Procedencia del semen = Semen Importado	1.114	1.034	1.200
For cohort Procedencia del semen = Semen Nacional	.759	.632	.911
N of Valid Cases	1227		

Tests of Homogeneity of the Odds Ratio

	Chi-Squared	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Breslow-Day	.000	0	.
Tarone's	.000	0	.

Tests of Conditional Independence

	Chi-Squared	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Cochran's	8.667	1	.003
Mantel-Haenszel	8.275	1	.004

Under the conditional independence assumption, Cochran's statistic is asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution, only if the number of strata is fixed, while the Mantel-Haenszel statistic is always asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution. Note that the continuity correction is removed from the Mantel-Haenszel statistic when the sum of the differences between the observed and the expected is 0.

ANEXO C.

Regresión logística.

		95.0% C.I. for EXP(B)							
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)		
		Lower							
		Upper	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper
Step 1(a)	dificult(1)	1.623	.359	20.419	1	.000	5.070	2.507	10.250
	Constant	-2.051	.354	33.555	1	.000	.129		
Step 2(b)	calidad_(1)	.894	.254	12.357	1	.000	2.445	1.485	4.025
	dificult(1)	1.621	.360	20.267	1	.000	5.057	2.497	10.240
	Constant	-2.879	.429	45.004	1	.000	.056		
Step 3(c)	calidad_(1)	.841	.256	10.836	1	.001	2.319	1.405	3.827
	dificult(1)	1.659	.361	21.143	1	.000	5.256	2.591	10.663
	t_transf(1)	.363	.121	8.961	1	.003	1.437	1.133	1.822
	Constant	-3.063	.435	49.568	1	.000	.047		
Step 4(d)	calidad_(1)	.829	.256	10.482	1	.001	2.290	1.387	3.783
	dificult(1)	1.624	.361	20.189	1	.000	5.071	2.498	10.297
	t_transf(1)	.360	.121	8.805	1	.003	1.434	1.130	1.819
	toro_or(1)	-.335	.133	6.334	1	.012	.716	.551	.929
	Constant	-2.776	.449	38.221	1	.000	.062		

a Variable(s) entered on step 1: dificult.

b Variable(s) entered on step 2: calidad_.

c Variable(s) entered on step 3: t_transf.

d Variable(s) entered on step 4: toro_or.