

## PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES DE RAZAS LECHERAS A GRAN ESCALA

L. S. Rafagnin M.<sup>1</sup>, K.C. Fernandes da Silva<sup>1</sup>, G.M. Gomes dos Santos<sup>1</sup>, J. H. Fortes P.<sup>2</sup>, M. M. Seneda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Clínicas Veterinárias - Universidade Estadual de Londrina  
Londrina, Paraná <sup>2</sup>In Vitro Brasil Ltda. Central de Biotecnologia, Mogi Mirim, SP  
E-mail: mseneda@uel.br

### Introducción

Los datos presentados por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones a finales de 2008 muestran una mayor participación de Brasil en relación con la producción y transferencia de embriones bovinos en el mundo en 2007, lo que representó casi un tercio de la producción mundial (32,8%). Con respecto a los embriones producidos in vivo total en el mundo, el país estaba por detrás del EUA, Canadá y Japón también. En el mercado de embriones producidos in vitro (PIV), por el contrario, el país ha consolidado un líder absoluto, lo que representa más del 85% del mundo (Thibier, 2008).

En el período 2002 a 2006, tendió a estabilizarse la FIV. La reducción de la tasa de crecimiento que se esperaba, debido a la reducción natural de la demanda y también debido a las limitaciones de la técnica, tales como dificultad para la criopreservación de embriones. A medida que la congelación de embriones es todavía limitado en la PIV (7,4% del total), el crecimiento en la transferencia de embriones (TE) puede reflejar una mayor demanda de embriones criopreservados, ya sea con fines de optimizar el uso de los receptores o fines de comercio (Viana, 2009).

A pesar de las limitaciones de la técnica, Brasil ha mostrado un fuerte impulso para reemplazar TE por *ovum pick up* (OPU) / PIV (Pontes *et al.*, 2009). Esto se debe a una peculiaridad del ganado cebú (*Bos indicus*), dado a las vacas que suelen tener más folículos ováricos y más ovocitos recuperados por OPU en comparación con el ganado *Bos taurus* (PONTES *et al.*, 2009). No hay ninguna explicación aparente para esta diferencia biológica intrigante. Sin embargo, la información disponible en la mayoría de OPU / PIV en Brasil se obtuvo de Nelore, responsable por aproximadamente el 80% del rebaño brasileño (acerca de 200 x 10<sup>6</sup> animales) (Pontes *et al.*, 2011).

Las razas cebuínas siguen representando la mayoría de los embriones producidos en Brasil, con 94,0% del total. De 2007 a 2009, sin embargo, hay un constante incremento en la participación de las razas lecheras en el mercado de los embriones, especialmente el cebú, como Gir (68,0% del total) y Girolando (22,4%), la única raza compuesta con una importante participación tanto en el TE y en la PIV (Viana, 2009). El interés por las razas cebuínas lecheras se debe a su capacidad de adaptación para producir grandes cantidades de leche bajo condiciones de estrés tales como altas temperaturas, parásitos y pastos pobres. El método de la PIV ha sido considerado para las donantes Girolando debido al aumento de la eficiencia del uso de semen sexado para la fertilización in vitro (Xu *et al.*, 2006), lo que facilita la producción de un gran número de hembras para la industria láctea.

La técnica de la OPU tiene la ventaja de ser sencilla, adecuado y permitir la recogida de ovocitos repetidas veces para procedimientos in vitro, incluyendo con aumento del número de folículos después de varias semanas de aspiraciones folicular (Stubbings & Walton, 1995). Otro aspecto positivo de la OPU/PIV es la posibilidad de producción de embriones en hembras preñadas. Esto es posible porque los ovarios mantienen su actividad durante el preñez, haciendo posible la recuperación de ovocitos. Si la técnica de la OPU es bien realizada, no hay riesgo de preñez y puede realizarse como aspiración folicular hasta el tercer mes de preñez, o hasta que el período en que el veterinario puede manipular los ovarios sin necesidad de un fuerte tirón. La aspiración folicular se presenta también como una alternativa a las hembras con limitaciones reproductivas, pero su aplicación es más ampliamente utilizada para una hembra con salud, que puede producir hasta cuatro veces más embriones que en el TE (Kruip *et al.*, 1994), pero con mayor costo por embrión (Rodrigues & García, 2000). Además, cada grupo de ovocitos se pueden inseminar con un toro diferente, lo que aumenta el número de posibles combinaciones genéticas (Merton *et al.*, 2003).

Es especialmente sin explicación cómo algunos animales se han producido cientos de ovocitos en un solo procedimiento OPU, sin ningún tipo de estímulo. Nuestro grupo de trabajo obtuvo 251 ovocitos por una vez (Seneda, M.M., datos no publicados) y

similares resultados se han relacionado por varios profesionales. Al parecer, existe una variación individual en la producción de ovocitos de donantes en *Bos indicus* (Watanabe et al., 1999). Teniendo en cuenta sólo la transferencia de embriones, es bien aceptada una media en torno a cinco a seis embriones transferibles por varias razas europeas (Castro Neto et al., 2005; Hansen & Block, 2004), lo mismo que nuestro grupo de trabajo tiene obtenido para Nelore. En condiciones de Brasil, una pequeña variación se observó en otras razas cebú, como Brahman con 7,3 embriones, 4,1 para Gir y el 5,7 por Guzera (Peixoto et al., 2006). Teniendo en cuenta todos los datos, llegamos a la conclusión de Nelore donantes presentar una distinción característica sólo en la producción de embriones in vitro.

Hay animales con un buen potencial para la OPU/PIV, debido a que presente de forma natural muy altos promedios de ovocitos y posteriormente buen número de los embriones y los preñeces. Por otra parte, algunos animales con menores promedios de ovocitos no debe ser indicado para la OPU / PIV, pero que pueden producir medio aceptable de embriones de MOET (Pontes et al., 2009).

### La producción de embriones

La PIV se utiliza para acelerar la producción de animales genéticamente superiores. Esta biotécnica implica las etapas de maduración (MIV) y fertilización (FIV) de ovocitos, así como el cultivo (CIV) de cigotos y embriones. Los ovocitos bovinos se pueden obtener de in vitro e in vivo por la punción folicular. El potencial de maduración, fecundación y desarrollo embrionario de los ovocitos se puede estimar por la aparición de células COC, con la siguiente clasificación. Grado I (GI) - Cumulus compacto, que contiene más de tres capas de células, ooplasma con granulaciones finas y homogénea, llenando el interior de la zona y de felpa de color marrón; Grado II (GII) - Cumulus compacto alrededor de los ovocitos o que rodea completamente el ovocito, con menos de tres capas de células, ooplasma con granulaciones distribuidos heterogeneamente y puede ser más concentrado en el centro y más claro en la periferia o condensada en un solo lugar se ve una mancha oscura; Grado III (GIII) - Ooplasma contratado, con espacio entre la membrana celular y zona pelúcida, llenando el espacio perivitelino irregular; Degenerado - vacuolizado o fragmentados; Desnudos - plenamente descubierta por los cúmulos de células o parte cubierta por ellos; Atrésico - oscuro cumulus oophorus o la presencia de signos de degeneración citoplásmica (59). La maduración del ovocito implica las modificaciones nucleares y citoplásmicas y está vinculada con cambios estructurales y bioquímicos que hacen la gameta femenina capaz de fertilización y posterior desarrollo embrionario. La mayoría de resultados indican que la adición de gonadotropinas en el medio de maduración de ovocitos bovinos aumenta la capacidad de fecundación del ovocito y mejora el posterior desarrollo embrionario. Se propone la adición de suero al medio de maduración como un requisito para lograr la perfecta expansión del cumulus y la maduración del ovocito. Después de la maduración de ovocitos, los espermatozoides viables obtenidos con gradiente de Percol o lavado espermático son colocados para la capacitación espermática y fertilización. Durante la pre-implantación de embriones ocurre la activación del genoma embrionario, la totalización y compactación de blastómeros, la diferenciación del trofoblasto y embrioblasto, la formación y expansión de blastocelo. Estos eventos pueden verse afectados por factores intrínsecos y extrínsecos, como los iones inorgánicos, tampones, composición de gas de la atmósfera, aminoácidos, pH, factores de crecimiento, la luz, vitaminas y macromoléculas (Gonçalves et al., 2001).

### Producción in vitro de embriones a gran escala

Hasta recientemente, la producción in vitro de embriones de razas lecheras a gran escala se limitaba por algunos obstáculos. El primero es el transporte de los embriones a larga distancia. Teniendo en cuenta que, especialmente en países como Brasil, las granjas con alta disponibilidad de receptores están generalmente a miles de kilómetros de las propiedades donde están las donantes de ovocitos. Además, como todavía no existían recientemente, algunos de estos obstáculos se han superado y ganado lechero se han beneficiado de la producción eficiente de grandes cantidades de embriones de hembras, que pueden ser transportados con éxito a largas distancias, lo que resulta en buenas tasas de embarazo (Pontes et al., 2010). A continuación se presentan algunas de las estrategias utilizadas por nuestro equipo y otros investigadores que han contribuido a facilitar la producción in vitro de embriones de razas lecheras de gran escala.

### Transporte a largas distancias

En un trabajo reciente, nuestro grupo, en asociación con una empresa brasileña de producción de embriones, evaluó un programa comercial de la producción in vitro de embriones producidos exclusivamente con el uso de semen sexado de los toros Holstein y Gir (Pontes et al., 2010). Se evaluaron 5047 OPU celebrada en hembras Gir, Girolando y Holstein. Los embriones fueron transportados a largas distancias para ser transferidos a los destinatarios (Tabla 1). Las tasas de embriones / ovocitos totales fueron similares para todos los tipos de donantes; *indicus*, *taurus*, o *indicus-taurus* (17,4 a 18,9) y también las tasas de embarazo (36 a 40 %).

Con respecto al transporte de los embriones en las primeras etapas del desarrollo embrionario, no hemos podido encontrar informes similares en la literatura. Esta estrategia fue propuesta en el inicio del proyecto, debido a la gran distancia desde el laboratorio a los destinatarios (hasta 2 000 km). Los probables cigotos tuvieron las células del cumulus extraídas y fueron transferidos a gotas de 100  $\mu$ L de medio de cultivo bajo aceite mineral a 39 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en el aire, permaneciendo en estas condiciones hasta el momento de la transferencia para la receptora. Embriones en diferentes etapas de desarrollo (Días 2-5; Día 0 = día de la FIV) fueron seleccionados para ser transportados a las granjas donde las receptoras se alojan. Debido a las largas distancias desde el laboratorio a las receptoras, las últimas etapas de cultivo de embriones se llevaron a cabo durante el transporte. A pesar de la duración variable de transporte desde el laboratorio a la granja, todos los embriones fueron transferidos en el Día 7. Los embriones fueron cargados en aviones, transportados en grupos de 40 en microtubos que contienen 400  $\mu$ L de medio de cultivo, en 300  $\mu$ L de aceite mineral, la temperatura y la atmósfera similar a la inicial de cultivo en la incubadora. Durante el transporte (24 a 72 h) del laboratorio a la hora de la transferencia, todos los tubos se mantuvieron en una incubadora para el transporte de los embriones (Tecnología Ceafepe Veterinaria, Sorocaba, SP, Brasil). Antes de la transferencia, cada embrión fue insertado en una paleta de 0,5 mL y transferido de manera no-quirúrgica en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo. No se registró la etapa de desarrollo del embrión en el momento de la transferencia, pero la gran mayoría se encontraba en la fase de mórula o blastocisto. Para aumentar las tasas de éxito de embarazo, se utilizó un protocolo de transferencia de embriones en tiempo fijo (Rodrigues *et al.*, 2010).

**Tabla 1.** Número de ovocitos recolectados y viables per donante (promedio  $\pm$  desvío estándar), número de embriones y preñez obtenidos a partir de donantes Gir (*B. indicus*), Holstein (*B. taurus*) y Girolando (*indicus-taurus*) sometidas a OPU-PIV con semen sexado.

e	Ovocitos total/ OPU (n)	Ovocitos viables/ OPU (n)	Embriones/ OPU-PIV (n)	Preñez / OPU-PIV (n)
<b>Gir</b>	17,1 $\pm$ 4,5 <sup>a</sup> (64617/3778)	12,1 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup> (45838/3778)	3,2 <sup>a</sup> (12243/3778)	1,2 <sup>a</sup> (3113/2670)
<b>Holstein</b>	11,4 $\pm$ 3,9 <sup>b</sup> (12977/1138)	8,0 $\pm$ 2,7 <sup>b</sup> (9082/1138)	2,1 <sup>b</sup> (2426/1138)	0,7 <sup>b</sup> (604/822)
<b>¾ Gir ¼ Holstein</b>	20,4 $\pm$ 5,8 <sup>c</sup> (5457/267)	16,8 $\pm$ 5,0 <sup>c</sup> (4472/267)	3,9 <sup>ac</sup> (1033/267)	1,3 <sup>ac</sup> (137/103)
<b>½ Gir ½ Holstein</b>	31,4 $\pm$ 5,6 <sup>d</sup> (7035/224)	24,3 $\pm$ 4,7 <sup>d</sup> (5434/224)	5,5 <sup>c</sup> (1222/224)	1,7 <sup>c</sup> (82/47)
<b>Total</b>	16,7 $\pm$ 6,3 (90086/5407)	12,0 $\pm$ 4,4 (64826/5407)	3,1 (16924/5407)	1,1 (3936/3642)

Promedio  $\pm$  DS con letras distintas en la misma columna difieren; P < 0,05.  
(Pontes *et al.*, 2010)

### El uso de semen sexado

Durante muchos años los ganaderos han buscado una forma de predeterminar el sexo de los terneros producidos, tanto por la necesidad de vaquillas de reemplazo de sus propios rebaños y el valor comercial de los terneros, que es considerablemente mayor para las hembras que para los machos (Wheeler *et al.*, 2003). La necesidad de producir embriones con el sexo definido se hace aún mayor cuando la producción se lleva a cabo in vitro, ya que algunos estudios describen un aumento en el porcentaje de machos en relación a los embriones generados in vivo (Rizos *et al.*, 2008). Camargo *et al.* (2010) reportaron que la producción in vitro de embriones Gir aumentó el porcentaje de machos en 76,9 % en comparación con la tasa esperada de 1:1. Una alta proporción de los machos hace del sistema de la PIV poco práctico para la producción de leche, provocando la reducción de la eficiencia y aumento de los costos (Camargo *et al.*, 2010).

En algunos países, la determinación del sexo de los embriones mediante biopsia y análisis de ADN se practica rutinariamente. Sin embargo, a pesar de ser una técnica sencilla y muy precisa, no es económicamente óptima, teniendo en cuenta que aproximadamente el 50% de los embriones son desechados porque no son del sexo deseado (Peippo *et al.*, 2009). Además, las tasas de embarazo son más bajas en embriones biopsiados en comparación con los embriones intactos (Hasler *et al.*, 2002).

El uso de semen sexado para la PIV ofrece ventajas sobre la determinación del sexo de los embriones por biopsia. La fecundación de los ovocitos con semen sexado para hembra permite que casi todos los embriones sean del sexo deseado, evitando la eliminación de los mismos. Además, porque no hay necesidad de una biopsia, los embriones producidos a partir del de semen sexado tienen la misma calidad de embriones generados con el semen convencional (Peippo *et al.*, 2009; 2010).

El método más utilizado para la producción de semen sexado es la citometría de flujo, que separa los espermatozoides X y Y por el contenido de ADN. Este método es bastante exacto, con 85 a 95% de los espermatozoides mostrando el cromosoma deseado (Seidel & Garner, 2003). A pesar de los espermatozoides que han sido presentados a esta técnica tener una menor movilidad, pueden ser utilizados con éxito para la PIV, teniendo en cuenta que en este sistema de producción un menor número de espermatozoides viables es suficiente para llevar a cabo la fertilización (Peippo *et al.*, 2010).

Hay una cierta variación entre los animales en su susceptibilidad al proceso de determinación del sexo de espermatozoides, por lo que la técnica parece poco práctica para algunos toros, en particular (Palmer *et al.*, 2008; Peippo *et al.*, 2009.). Además, algunos estudios reportan una tasa de blastocisto inferior por el semen sexado en comparación con el convencional (Blondin *et al.*, 2009). Sin embargo, en el trabajo realizado por nuestro grupo, se obtuvieron tasas aceptables de embriones / ovocitos totales y de embarazo, incluso con el uso de 15 diferentes toros (Pontes *et al.*, 2010).

### **Criopreservación de embriones PIV**

Existen básicamente dos técnicas que se utilizan para criopreservación de embriones. La primera es conocida como la congelación convencional, y requiere equipos especiales que promueven una disminución lenta y controlada de la temperatura. Este enfriamiento controlado permite el intercambio entre fluidos intra y extracelular, minimizando el daño osmótico y la deformación de las células (Vajta & Kuwayama, 2006). Esta técnica es ampliamente utilizada para los embriones generados in vivo, y a estos embriones proporciona tasas de embarazo similares a los obtenidos después de la transferencia de embriones frescos (Hasler, 2001). La segunda técnica, la vitrificación, previene la formación de cristales de hielo intracelular a través de la rápida velocidad de enfriamiento y una alta concentración de crioprotectores, causando una reducción de los efectos nocivos de la refrigeración (Saragusty & Arava, 2011). Esta metodología tiene ventajas tales como la simplicidad, rapidez y bajo costo del procedimiento.

Embriones PIV son extremadamente sensibles a la congelación convencional, y aparentemente hay una mayor susceptibilidad de embriones *B. indicus* producidos in vitro, con resultados que tienden a ser muy bajos y / o altamente variables (Visintin *et al.*, 2002; Zanenga, 1993). Los embriones PIV son diferentes de los embriones generados in vivo en muchos aspectos. Las principales diferencias son la mayor cantidad de lípidos en el citoplasma (Crosier *et al.*, 2000; FAIR *et al.*, 2001), la compactación incompleta de los blastómeros (Van Soom *et al.*, 1997), reducción de la densidad de las mitocondrias maduras (Crosier *et al.*, 2000) y más frágil zona pelúcida (Duby *et al.*, 1997). A pesar de todas las diferencias estructurales entre los embriones PIV y los generados in vivo, hay evidencia de que la alta susceptibilidad de los embriones PIV a los daños causados por el proceso de criopreservación se debe principalmente a la gran cantidad de gránulos de lípidos en el citoplasma (Abe *et al.*, 2002; Pryor *et al.*, 2011).

La vitrificación es considerada el método más adecuado para la criopreservación de embriones PIV. En las últimas décadas, fueron creados nuevos contenedores para el almacenamiento de los embriones durante la criopreservación, con el fin de bajar el volumen y permitir una mayor velocidad de enfriamiento (Saragusty & Arav, 2011). También se crearon técnicas que permiten la transferencia directa de embriones después del recalentamiento (Akiyama *et al.*, 2010). Sin embargo, los resultados permanecen estancados en niveles que no permiten la viabilidad comercial de esta técnica, y bajas tasas de embarazo después de la transferencia de embriones criopreservados impiden el uso eficiente de los embriones sobrantes. A pesar de la PIV ha sido considerado como una tecnología madura en general (Van Wagtendonk-De Leeuw, 2005), el aspecto de congelación en embriones, principalmente del ganado cebú presenta una enorme brecha por cubrir.

### **Perspectivas**

El nuevo protocolo descrito para transporte de los embriones durante el período inicial de desarrollo ha demostrado ser posible obtener tasas aceptables de embarazo después del transporte de embriones a larga distancia. Los resultados son prometedores, con un gran potencial para las solicitudes de comercio nacional y internacional de embriones bovinos. Además, los últimos resultados descritos en la literatura con el uso de semen sexado han demostrado ser posible su uso exitoso en la PIV de las razas lecheras. Se espera que el uso de semen sexado afecte a la estructura de la industria lechera mediante la creación de una mayor oferta de novillas de reemplazo, que tendrán su costo reducido. El precio del semen sexado tiende a disminuir considerablemente con el tiempo, reduciendo así el costo de producción de leche. Las principales limitaciones para el uso de

semen sexado se han corregido, y la eficiencia de la determinación del sexo del procesador debe aumentar gradualmente durante los próximos años (Wheeler et al., 2006), asegurando la expansión del uso de semen sexado en la industria lechera. Aunque no hay una metodología adecuada para la criopreservación de embriones PIV,, esta técnica parece ser más prometedor para la producción a gran escala de hembras lecheras. Una vez que superado este obstáculo, el proceso de producción de embriones de razas lecheras se verá facilitado y más eficiente, contribuyendo aún más al engrandecimiento de la ganadería nacional.

#### Referencias Bibliográficas

- Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., Hoshi, H. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free medium or in serum-containing medium. *Molecular Reproduction Development* **61**: 57–66.
- Akiyama, K., Kobayashi, J., Sato, Y., Sata, R., Ohashi, M., Sasaki, E., Oda, Y., Ogawa, Y., Ueda, S., Nabenishi, H., Matoba, S. 2010. Calf production from vitrified bovine sexed embryos following in-straw dilution. *Animal Science Journal* **81**: 461–466.
- Blondin, P., Beaulieu, M., Fournier, V., Morin, N., Crawford, L., Madan, P., King, W.A. 2009. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology* **71**: 30-38.
- Camargo, L.S.A., Freitas, C., Sa, W.F., Ferreira, A.M., Serapiao, R.V., Viana, J.H.M. 2010. Gestation length, birth weight and offspring gender ratio of in vitro-produced Gyr (*Bos indicus*) cattle embryos. *Animal Reproduction Science* **120**: 10–15.
- Castro Neto, A.S., Sanches, B.V., Binelli, M., Seneda, M.M., Perri, S.H., Garcia, J.F. 2005. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. *Theriogenology* **63**: 1249-1255.
- Crosier, A.E., Farin, P.W., Dykstra, M.J., Alexander, J. E., Farin, C. E. 2000. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. *Biology of Reproduction* **62**: 1459–1365.
- Duby, R.T., Hill, J.L., O'callaghan, D., Overstrom, E.W., Boland, M.P. 1997. Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. *Theriogenology* **47**: 332.
- Fair, T., Lonergan, P., Dinnyes, A., Cottell, D.C., Hyttel, P., Ward, F.A., Boland, M.P. 2001. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of embryo production. *Molecular Reproduction and Development* **58**: 186–195.
- Garner, D.L., Seidel, G.E. 2003. Past, present and future perspectives on sexing sperm. *Canadian Journal of Animal Science* **83**: 375–384.
- Gonçalves, P.B.D, Visintin, J.A., Oliveira, M.A.L., Montagner, M.M., Costa, L.F.S. 2001. Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves, P.B.D., Figueiredo, J.R., Freitas, V.J.F. (Ed.) *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, p. 195-226.
- Hansen, P.J., Block, J. 2004. Towards an embryonic world: the current and potential uses of embryo Technologies in dairy production. *Reproduction, Fertility and Development* **16**: 1-14.
- Hasler, J.F., Cardey, E., Stokes, J.E., Bredbacka, P. 2002. Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment. *Theriogenology* **58**: 1457–1469.
- Hasler, J.F. 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* **56**: 1401–1415.
- Kruip, T.A.M., Boni, R., Wurth, Y.A., Roelofsen, M.W.M., Pieterse, M.C. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* **42**: 675-684.
- Merton, J.S., Roos, A.P.W., Mullaart, E., Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P.L.A.M, Dieleman, S.J. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* **59**: 651-674.
- Palma, G.A., Olivier, N.S., Neumüller, C.H., Sinowatz, F. 2008. Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of in vitro fertilization and ultrastructure of in vitro produced bovine blastocysts. *Anatomía, Histología, Embriología* **37**: 67-73.
- Peippo, J., Rätty, M., Korhonen, K., Eronen, M., Kananen, K., Hurme, T., Halmekytö, M., Mäki-Tanila, A. 2010. Impact of in vitro fertilization of bovine oocytes with sex-sorted frozen-thawed spermatozoa on developmental kinetics, quality and sex ratio of developing embryos. *Zygote* **18**: 185-194.
- Peippo, J., Vartia, K., Kananen-Anttila, K., Rätty, M., Korhonen, K., Hurme, T., Myllymäki, H., Sairanen, A., Mäki-Tanila, A. 2009. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Animal Reproduction Science* **111**: 80-92.
- Peixoto, M.G.C.D., Bergmann, J.A.G., Fonseca, C.G., Penna, V.M., Pereira, C.S. 2006. Effects of environmental factors on multiple ovulation of zebu donors. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **58**(04): 567-574.
- Pontes, J.H.F., Nonato-Junior, I., Sanches, B.V., Ereno-Junior, J.C., Uvo, S., Barreiros, T.R.R., Oliveira, J.A., Hasler, J.F., Seneda, M.M. 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* **71**: 690-697.
- Pontes, J.H.F., Silva, K.C.F., Basso, A.C., Ferreira, C.R., Santos, G.M.G., Sanches, B.V., Porcionato, J.P.F., Vieira, P.H.S., Faifer, F.S., Sterza, F.A.M., Schenk, J.L., Seneda, M.M. 2010. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* **74**: 1349-1355.

- Pontes, J.H.F., Melo Sterza, F.A., Basso, A.C., Ferreira, C.R., Sanches, B.V., Rubin, K.C.P., Seneda M.M. 2011. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* **75**: 1640–1646.
- Pryor, J.H., Looney, C.R., Romo, S., Kraemer, D. C., Long, C.R. 2011. Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post-thaw laser assisted hatching. *Theriogenology* **75**: 24–33.
- Rizos, D., Bermejo-Alvarez, P., Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P. 2008. Effect of duration of oocyte maturation on the kinetics of cleavage, embryo yield and sex ratio in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* **20**: 734–740.
- Rodrigues, C.A., Teixeira, A.A., Ferreira, R.M., Ayres, H., Mancilha, R.F., Souza, A.H., Baruselli, P.S. 2010. Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. *Animal Reproduction Science* **118**: 110-117.
- Rodrigues, C.F.M., García, J.M. 2000. Fecundação *in vitro*: aplicação comercial. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS* **28**(1): 186-187.
- Saragusty, J., Arav, A. 2011. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by low freezing and vitrification. *Reproduction* **141**: 1-19.
- Seneda, M.M., Esper, C.R., García, J.M., Vantini, R., Oliveira, J.A. 2001. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science* **67**: 37-43.
- Stubbings, R.B. & Walton, J.S. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology* **43**: 705-712.
- Thibier, M. 2008. Data Retrieval Committee Statistics of Embryo Transfer- Year 2007: The worldwide activity in farm animals embryo transfer. *Embryo Transfer Newsletter* **26**: 4-9.
- Vajta, G., Kuwayama, M. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* **65**: 236–244.
- Van Soom, A., Ysebaert, M., De Kruif, A. 1997. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in *in vitro*-produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* **47**: 47-56.
- Van Wagtendonk-De Leeuw, A.M. 2006. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* **65**: 914-925.
- Viana, J.H.M. 2009. Mudanças e tendências no mercado de embriões bovinos no Brasil. *O Embrião* **42**: 5-7.
- Visintin, J.A., Martins, J.F.P., Bevilacqua, E.M., Mello, M.R.B., Nicacio, A.C., Assumpção, M.E.O.A. 2002. Cryopreservation of *Bos taurus* vs. *Bos indicus* embryos: are they really different? *Theriogenology* **57**: 345-359.
- Watanabe, M.R., Watanabe, Y.F., Franceschini, P.H., Dayan, A., Lobo, R.B. 1999. Variation in ultrasound guided oocyte recovery in Nelore cows per session and *in vitro* embryo production. *Theriogenology* **51**: 438-438 (Abstract).
- Wheeler, M. B., Rutledge J. J., Fischer-Brown, A., Vanetten, T., Malusky. S., Beebe D. J. 2006. Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle. *Theriogenology* **65**: 219–227.
- Xu, J., Guo, Z., Su, L., Nedambale, T.L., Zhang, J., Schenk, J., Moreno, J.F., Dinnyés, J.F., Ji, W., Tian, X.C., Yang, X., Du, F. 2006. Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized *in vitro* with sex-sorted sperm. *Journal of Dairy Science* **89**: 2510-2518.
- Zanenga, C.A. 1993. Freezing on zebu embryos - Development and viability. *Abstracts of 5<sup>th</sup> Brazilian Congresso on Animal Reproduction*. Belo Horizonte, MG, Brazil.