

Artículo original:

PRODUCCIÓN DE EMBRIONES POR FECUNDACION *in vitro* DE “DONANTES PROBLEMA” DE RAZAS TAURINAS (*Bos taurus*)

Embryo production by *in vitro* fertilization of “problem donors” of Taurus breeds (*Bos taurus*)

J.P. Anchordoquy (1); S. Huter (1); N. Farnetano (1); J. Irouleguy (1); E. Martín (1); M. Arzeno (1); I. Mujica (1); E. Roberto Siqueira (2); C. Hernández (3); C.J. Munar (1).

(1) *Munar y Asociados S.A. Centro Genético Bovino Eolia, Marcos Paz (B), Argentina*

(2) *In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, Brasil.*

(3) *Biotecnología Animal, Medellín, Colombia.*

Email:

cmunar@munar.com.ar

Palabras Clave:

Vacas problema, in vitro, transferencia, IVF

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar los resultados obtenidos con Fertilización *in vitro* (FIV) como método alternativo de la superovulación y transferencias embrionaria (MOET) para multiplicar donantes “problema” de razas taurinas (*Bos taurus*), utilizando semen convencional y semen sexado en vaquillonas Holando. Los trabajos fueron realizados en el Centro Genético Bovino Eolia con tecnología de In Vitro Brasil. Los folículos ováricos > 3mm de 48 donantes fueron aspirados por vía transvaginal en 259 sesiones de OPU con intervalos de 14 días. Se obtuvieron 8,3 +/- 4,1 ovocitos/OPU; 4,3 +/- 2,2 viables; la FIV con semen convencional produjo 1,9 embriones por OPU, 472 blastocistos de 1318 ovocitos maduros (35,8%). Con semen sexado se obtuvo 2,5 embriones por OPU, 35 blastocistos de 99 ovocitos maduros (35,3%). Se obtuvieron embriones de todas las donantes. Las receptoras fueron sincronizadas con prostaglandinas y control de celos. Los diagnósticos de preñez con ultrasonido fueron efectuados a los 30, 60 y 90 días de gestación. Se obtuvo el 45,6% de preñez de las transferencias de embriones frescos. Los resultados obtenidos permiten afirmar que la producción de embriones por el sistema de FIV es una alternativa para la multiplicación de donantes “problema”.

INTRODUCCIÓN

Las biotecnologías de la reproducción, la inseminación artificial y la transferencia embrionaria son ampliamente utilizadas para mejorar la genética de los rodeos bovinos. La producción de embriones se puede realizar mediante superovulación y fertilización *in vivo* (MOET), y con los sistemas “*in vitro*” que incluyen la fertilización *in vitro* (FIV) y la transferencias nuclear (NT) o clonación. La FIV es una tecnología que permite a los criadores obtener descendencia de vacas abiertas, vacas gestantes, vaquillonas vírgenes e incluso de donantes “problema” de alto valor genético, con infertilidad adquirida o que no responden a los tratamientos superovulatorios. En el presente trabajo se utilizó la FIV como tratamiento clínico para la producción de embriones en vacas “problema”. El uso del semen sexado para producir embriones se está difundiendo en los rodeos comerciales Holstein, con el fin de producir vaquillonas de reemplazo, así como en programas de mejoramiento genético (Wilson *et al.*, 2005). La técnica de FIV ha aumentado la eficiencia en la producción de embriones con semen sexado (Munar *et al.*, 2012).

DONANTES

En este trabajo se reportan los resultados de 48 donantes de alto valor genético de las razas taurinas (*Bos taurus*) Angus (n=25), Hereford (n=5), Holstein (n=17) y Limousin (n=1)

categorizadas como “donantes problema”, que habían sido retiradas de los programas convencionales de transferencias embrionarias (MOET) debido a su bajo rendimiento. La condición corporal promedio fue 7 ± 1 (escala 1-9), presentando todas las donantes actividad ovárica (basado en palpación transrectal y ultrasonografía) durante el período reportado. La condición fisiológica fue de “seca y vacía” en todos los casos, a excepción de una vaca Hereford que se encontraba cursando el primer trimestre de gestación. Se realizaron un total de 259 sesiones de aspiración folicular transvaginal (OPU), con una media de $5,4 \pm 3,9$ sesiones de OPU por donante (rango 1 a 12 OPU/donante).

RECUPERACIÓN DE OVOCITOS

La producción *in vitro* de embriones consiste en cuatro pasos principales: la recuperación de ovocitos, la maduración *in vitro* de los ovocitos recuperados (MIV), la fertilización *in vitro* propiamente dicha (FIV) y el cultivo *in vitro* de los embriones resultantes (CIV). Los ovocitos se obtienen por aspiración de los folículos ováricos por vía transvaginal guiada por ecografía, técnica denominada Ovum Pick-up (OPU), la cual fue descrita por primera vez en el bovino por Pieterse *et al.* (1988). La tasa de ovocitos recuperados a partir de los folículos aspirados es generalmente del 60-70%. La OPU se puede realizar con tanta frecuencia como dos veces por semana, durante varios meses sin afectar la vida reproductiva

de la donante (Bols, 2005; van Wagtenonk-de Leeuw, 2006). Bage *et al.* (2003) informaron que no hubo agotamiento de la población folicular en los ovarios con un régimen intensivo de aspiración, el cual incluyó de 11-19 sesiones de OPU durante tres a seis ciclos estrales. En el presente trabajo las donantes se aspiraron con un intervalo de 14 días durante 0,5 a 6 meses sin notar disminución en el número de folículos. Tampoco se observaron evidencias de inflamación o infección en el sitio de aplicación de la anestesia epidural asociado con las OPU, en concordancia con lo descrito por McEvoy *et al.*, (2002); ni signos de adherencia ovárica como consecuencia de las repetidas aspiraciones y en drásticamente antes del parto y las concentraciones.

RECUPERACIÓN DE OVOCITOS POR ASPIRACIÓN TRANSVAGINAL (OPU)

Antes de cada OPU se prepararon las donantes higienizando el área de la grupa con Iodopovidona al 5% y luego con alcohol para aplicar en el espacio sacro coccígeo 8 ml de lidocaína al 2% junto a 1 cc de acepromacina (10 mg/ml) para lograr la anestesia epidural baja. Luego se evacuó el recto y se limpió toda la zona del periné con Iodopovidona al 5% y luego con alcohol antes de introducir la guía de aspiración. Para la OPU se utilizó un transductor microconvexo de 7.5 Mhz (Mindray DP10) junto a la guía de aspiración folicular. La aspiración se realizó mediante un catéter intravenoso de 16G conectado mediante un circuito cerrado de tubuladuras a un tubo cónico de 50 ml. La presión de aspiración se obtuvo mediante una bomba de vacío (Cook Veterinary Products, Queensland, Australia) con una presión de -75 mm de Hg. La bomba de aspiración estaba acoplada a un sistema de calentamiento (Cook Veterinary Products, Queensland, Australia) para los tubos cónicos, con el propósito de no someter los ovocitos a estrés térmico durante el proceso de aspiración.

La visualización de los folículos previos a cada sesión de OPU permite determinar la población folicular y la dinámica ovárica de cada una de las donantes. Luego de realizar la aspiración de los folículos mayores a 3 mm de diámetro, se realizó la limpieza de la tubuladura con una solución de PBS (PBS-Nutricell, Campinas, SP, Brasil), suplementada con 400UI de heparina sódica (Heparina Sódica, Fada Pharma, Bs. As., Argentina) por litro de PBS empleado, con el fin de disminuir la presentación de posibles coágulos de sangre en la tubuladura, que disminuyan la recuperación de ovocitos.

PRODUCCIÓN *in vitro* DE EMBRIONES

Luego de la OPU, el contenido de los tubos cónicos se lavó y se filtró en un filtro Emcon (Immuno Systems Inc., Spring Valley, WI, USA), con solución buffer fosfato (PBS-Nutricell, Campinas, SP, Brasil) suplementado con 1% de suero fetal bovino. La búsqueda y aislamiento de los ovocitos se realizó con lupa estereoscópica a 15X. Los complejos Ovocito y Células del Cumulus (COC) se clasificaron de acuerdo al número de capas de células del cúmulus y a la apariencia del citoplasma de los ovocitos de la siguiente manera: Grado 1 (G1), más de tres capas de células del cúmulus; Grado 2 (G2), dos capas de células del cúmulus; Grado 3 (G3), una capa de células; Desnudos (D), parcialmente cubiertos con células o sin células del cúmulus, y Atrésico, cúmulus oophorus oscuro y signos de degeneración citoplasmática. Los ovocitos G1, G2 y G3 se

consideran viables (ovocitos con citoplasma homogéneo en todos los casos) y fueron utilizados junto a los D, mientras que los COC atrésicos fueron descartados.

Antes de la MIV, los COC se lavaron tres veces en TCM-199 HEPES (In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, Brasil). Luego, los COC de cada donante se cultivaron por separado durante 24 horas en gotas de 100 µl de medio de maduración (TCM-199; In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, Brasil) bajo aceite mineral (D'Altomare, Santo Amaro, SP, Brasil) a 39 °C y 5% de CO₂ en aire.

Para la FIV, se utilizó semen congelado de toros seleccionados por los clientes. Las pajuelas se descongelaron durante 30 segundos en baño de agua a 35°C. Los espermatozoides se lavaron por centrifugación a 4000 RPM durante 10 min a través de un gradiente de Percoll (90-45%). Luego, se descartó el sobrenadante y el pellet se diluyó en medio FIV y se centrifugó nuevamente a 2000 RPM durante 3 min. Luego de tomar el pellet, los espermatozoides fueron diluidos en 30 µl de medio FIV. El medio FIV (In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, Brasil) fue suplementado con heparina, penicilamina, hipotaurina y epinefrina para capacitar y estimular la motilidad de los espermatozoides. Cada gota de fertilización recibió 4 µL de la suspensión de espermatozoides, para obtener una concentración final de 100.000 espermatozoides motiles en la microgota de 100 µL. Después de la inseminación, se realizó una evaluación visual de la motilidad y la concentración espermática en la gota. En casos donde la concentración de espermatozoides progresivos alcanzada con los 4 µL fue muy baja, se le adicionó otros 4 µL de la suspensión de espermatozoides.

Luego de la maduración en TCM-199, los COC se lavaron tres veces en un medio de pre-fertilización (In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, Brasil). Luego se pasaron al medio de FIV para la inseminación en gotas de 100 µl de medio FIV (In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, Brasil) bajo aceite mineral a 39 °C y 5% de CO₂ en aire, y se cultivaron durante 24 horas. Luego, los presuntos cigotos fueron desnudados de las células del cúmulus por pipeteo y se transfirieron a microgotas de 100 µl de medio de cultivo de embriones SOF (In Vitro Brasil, Mogi Mirim, SP, Brasil), en las mismas condiciones de temperatura y atmosfera utilizadas para la FIV. El Día 3 de cultivo se realizó el "primer feeding", el cual consiste en el recambio del 50% del medio SOF y el retiro de los ovocitos sin fertilizar. Dos días después (Día 5), se cambió el 50% del medio de la microgota por un medio SOF post compactación ("2° feeding"), el cual posee en su composición sustancias deslipidificantes que favorecen la posterior y eventual vitrificación. En Día 6 se realizó la previsión para poder estimar los embriones que se obtendrían en Día 7, favoreciendo así, la organización de las transferencias. Únicamente se utilizaron embriones en estadio de blastocisto en día 7 (Día 0= día de la FIV) para las transferencias de embriones frescos o la vitrificación. Blastocistos en los diferentes estadios desde tempranos hasta eclosionados, de calidad 1, 2 y 3 fueron transferidos en fresco. Mientras que para la vitrificación se seleccionaron blastocistos medianos y expandidos de calidad 1 y 2.

SINCRONIZACIÓN DE CELOS EN RECEPTORAS

Las receptoras se encontraban alojadas en el Centro Genético Bovino Eolia. La sincronización de celos se realizó con prostaglandina (PG), mediante la inyección intramuscular de 150 µg de D-Cloprostenol (Acceleration-D, Vabriela, Bs. As., Argentina) dos días antes de la OPU. El celo fue detectado dos veces por día (AM-PM) entre 48 y 96 horas después de la inyección de PG. Los embriones fueron transferidos entre el día 6 y 8,5 del ciclo de la receptora. De acuerdo al esquema de aspiración quincenal utilizado, las receptoras que no fueron transferidas o no manifestaron celo, recibieron otra dosis de PG con intervalos de 14 días, mejorando de este modo el aprovechamiento del rodeo de receptoras (Munar *et al.*, 1988).

Antes de la transferencia embrionaria, los ovarios de cada receptora fueron examinados por palpación rectal para confirmar la presencia y el tamaño del cuerpo lúteo (Munar *et al.*, 1988). Solo las receptoras con un CL de más de 1,5 cm de diámetro recibieron un embrión. Los embriones fueron transferidos con el método no quirúrgico utilizando la vaina miniaturizada azul de Munar-Cassou (Munar *et al.*, 1987), depositándolos en el tercio anterior del cuerno uterino del mismo lado correspondiente al ovario portador del CL.

El diagnóstico precoz de gestación en las receptoras fue realizado con ultrasonido entre los 28 y 35 días de gestación. Luego se repitió el examen con ultrasonido entre los 60 a 70 días para diagnosticar el sexo fetal de acuerdo a la localización del tubérculo genital, (Curran *et al.*, 1989; Wideman *et al.*, 1989; Viana *et al.*, 1992). Finalmente se diagnosticaron a los 90 a 120 días de gestación por palpación rectal.

RESULTADOS Y COMENTARIOS

En el presente trabajo se recuperaron $8,3 \pm 4,1$ ovocitos totales por OPU, de los cuales $4,3 \pm 2,2$ fueron ovocitos viables (Tabla 1).

Tabla 1: Resumen de resultados obtenidos de FIV en donantes “problema” Bos Taurus con semen convencional.

	N=	Promedio +/- d.s.	Rango / %
Donantes	48		
Sesiones de OPU	259	5,4 +/- 3,9	1 a 12
Ovocitos (COC)	2149	8,3 +/- 4,1	0 a 38
Ovocitos viables	1318	4,3 +/- 2,2	0 a 20
Blastocistos (día 7)	472	1,9	35,8%
Transferidos TEF	143		
Pañadas de TEF	127/58*	45,6%	
Vitrificados	249		
Descartados (por calidad o estadio)	80		

Diversos autores han publicado que el número de ovocitos recolectados de hembras Bos taurus mediante OPU, es tres a cuatro veces menor que el promedio obtenido de donantes Bos indicus (Rubin *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2007). El número promedio de ovocitos colectados por OPU en ganado Bos taurus es menor a 8 por donante (Senatore *et al.*, 2010). En raza Holstein, Pontes *et al.*, (2010) obtuvieron $11,4 \pm 3,9$ ovocitos totales y $8,0 \pm 2,7$ ovocitos viables por aspiración. Si bien, se ha publicado que el tratamiento previo con Somatotrofina bovina y/o FSH

mejora la morfología (Roth *et al.*, 2002) y aumenta el número de ovocitos colectados a través de OPU (Goodhand *et al.*, 1999), en este trabajo no se obtuvo ninguna mejoría con el empleo de estos tratamientos en donantes con baja producción de ovocitos, solo se observó un aumento del tamaño folicular.

El porcentaje de blastocistos obtenidos con semen convencional fue de 35,8% (472 embriones/1318 ovocitos maduros) mientras que con semen sexado alcanzó el 35,3% (35/99). En la actualidad, el porcentaje de embriones obtenidos por FIV a partir de ovocitos viables es de 30 al 40% (Mermillod *et al.*, 2006). Ese porcentaje desciende cuando se utiliza semen sexado en la FIV. Esto se debe al daño inducido durante el proceso de clasificación de los espermatozoides X e Y, cuando son expuestos a una serie de riesgos potenciales, incluyendo la centrifugación, la exposición a la coloración del ADN, la alta presión, la luz láser, y la carga eléctrica (Maxwell *et al.*, 2004).

La producción de embriones viables, blastocistos tempranos, medianos, expandidos y eclosionados en el día 7 después de la FIV fue de 1,9 embriones/OPU con semen convencional y 2,5 embriones/OPU con semen sexado (Tabla 2). Este valor es similar al reportado para hembras Bos Taurus, donde se obtuvieron entre 1,7 (una aspiración/semana; Roschlaw *et al.*, 2001) y 2,5 embriones por OPU (2 aspiraciones/semana; Galli *et al.*, 2003).

Tabla 2: Resumen de resultados obtenidos de FIV en vaquillonas Holando, donantes “problema”, con semen sexado.

	N=	Promedio +/- d.s.	Rango / %
Donantes	15		
Sesiones de OPU	15	1	-
Ovocitos (COC)	144	8,6 (+/- 22,2)	0 a 19
Ovocitos viables	99	6,7 (+/- 10,5)	0 a 16
Blastocistos (día 7)	35	2,5	35,3%
Vitrificados	35		
Transferidos	0		

La tasa de preñez obtenida con la transferencia de embriones frescos producidos *in vitro* fue del 45,6%. Este resultado es menor a las tasas obtenidas con embriones frescos producidos *in vivo* (MOET) en nuestro laboratorio (64%), (Munar *et al.*, 1990). Hasta el momento no contamos con los resultados de preñez de las transferencias de embriones vitrificados.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten afirmar que la producción de embriones por el sistema de FIV es una alternativa para la multiplicación de donantes “problema”. De todas las donantes tratadas se obtuvieron embriones, siendo el promedio $10,6 \pm 10,7$ embriones por donante en un periodo de tiempo de $2,8 \pm 1,9$ meses de trabajo (rango 0,5 a 6 meses), cantidad comparable con la producción de embriones con el sistema MOET en vacas normales.

REFERENCIAS

1. Båge R, Petyim S, Larsson B, Hallap T, Bergqvist AS, Gustafsson H, Rodríguez-Martínez H. 2003. Oocyte competence in repeat-breeder heifers: effects of an optimized ovum pick-up schedule on expression of oestrus, follicular development and fertility. *Reprod Fertil Dev.* 15(1-2):115-23.
2. Bols P. E. 2005. Puncture of immature ovarian follicles in bovine assisted reproduction. *Verh K Acad Geneesk Belg* 67(3):177-202.
3. Curran S.; O.J. Ginther 1989. Ultrasonic determination of fetal gender in horses and cattle under farm conditions. *Theriogenology* 36 (5), 809-814.
4. Curran S., J.P. Kastelic y O.J. Ginther. 1989. Determining sex of the bovine fetus by ultrasonic assessment of relative location of genital tubercle. *Animal Reproduction Science* 19, 217-227.
5. Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59(2):599-616.
6. Goodhand, K.L., Watt, R.G., Staines, M.E., Hutchinson, J.S.M. & Broadbent, P.J. 1999. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*, 51, 951-961.
7. Hasler JF. 2000. In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Hum Reprod. Dec*; 15 Suppl 5:47-58.
8. Machado SA, Reichenbach HD, Weppert M, Matos LF, Wolf E, Gonçalves PBD. 2006. The variability of ovum pick-up response and *in vitro* embryo production from monozygotic twin cows. *Theriogenology*; 65:573-83.
9. Martins A, Jr Takada L, Abrahão RG, Freitas CP, Calegari RS. Follicular aspiration of calves oocytes by videoendoscopy: a successful approach to maximize *in vitro* bovine embryo production. *Acta Scientiae Veterinariae* 2007;35:1194(abstract).
10. Maxwell WM, Evans G, Hollinshead FK, Bathgate R, De Graaf SP, Eriksson BM, Gillan, Morton KM, O'Brien JK. 2004. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Anim Reprod Sci*; 82-83: 79-95.
11. McEvoy TG, Thompson H, Dolman DF, Watt RG, Reis A, Staines ME. 2002. Effects of epidural injections and transvaginal aspiration of ovarian follicles in heifers used repeatedly for ultrasound-guided retrieval of ova and embryo production. *Vet Rec.* Nov 30;151(22):653-8.
12. Mermillod P, Locatelli Y, Dalbiès-Tran R., Uzbekova S., Baril G., Guignot F., Perreau C., Poulin N., Touzé J. L., Penetier S., Schmaltz B, and Cognié Y. 2006. *in vitro* production of ruminant embryos: results, limits and perspectives. 2006. *Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture, Tainan (Taiwan, R.O.C.)*, November 7-10
13. Munar, C.J., Nigro, M.A. and Cassou, B. 1987. Non-surgical transfer of bovine embryos under farm conditions using a new Cassou transfer device. *Theriogenology* 27:261
14. Munar, C.J., Nigro, M.A., Burry, E.R. and Vautier, R.A. 1988. Examen clínico del aparato genital durante el ciclo estral en la vaca. *Revista CABLA* 12:23-24.
15. Munar, C.J., Nigro, M.A., Burry, E.R. and Vautier, R.A. 1988. Sincronización de celos en receptoras. *CADLA* 12:54-59.
16. Munar, C.J., Nigro, M.A., Burry, E.R. and Vautier, R.A. and Argerich, C. 1990. Quality control in a large-scale embryo transfer program under farm conditions in the Argentine Republic: Quality control factors and results. *Theriogenology* 33:5-8
17. Munar, C.J. Transferencia de embriones sexado Holando Argentino en vacas de cría: El ABC del negocio. *Conferencia Jornadas Taurus*, Sept. 2012. Revista Taurus
18. Pieterse MC, Kappen KA, Kruip ThAM, Taverne MAM. 1988. Aspiration of bovine oocytes during trans-vaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*; 30: 751 - 762.
19. Pontes JH, Silva KC, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GM, Sanches BV, Porcionato JP, Vieira PH, Faifer FS, Sterza FA, Schenk JL, Seneda MM. 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(8):1349-55.
20. Roschlau K, Kuwer A, Roschlau D, Michaelis U, Dexne U, Kuhnt C and Poppe P. 2001. Practical use of OPU/IVP in modern cattle breeding. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 44: 99-101.
21. Roth, Z., Arav, A., Braw-tal, R., Bor, A. & Wolfenson, D. 2002. Effect of treatment with follicle-stimulating hormone or bovine somatotropin on the quality of oocytes aspirated in the autumn from previously heat-stressed cows. *Journal of Dairy Science*, 85:1398-1405.
22. Rubin KCP, Pontes JHF, Nonato I, Jr. Ereno JC, Jr. Pansard H, Seneda MM. 2005. Influence of Nelore blood on the *in vivo* production of oocytes. *Acta Scientiae Veterinariae*; 33:183(abstract).
23. Senatore EM, Xu J, Suárez Novoa MV, Gong G, Lin T, Bella A, Moreno JF, Mannino ME, Tian X, Presicce GA, Wu SC, Du F. 2010. Improved *in vitro* development of OPU-derived bovine (*Bos taurus*) embryos by group culture with agarose-embedded helper embryos. *Theriogenology*; 74(9):1643-51
24. van Wagtenonk-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(5):914-925.
25. Viana G.I, A.M.Valdéz, C.J. Munar, M.A.Nigro, E.R. Burry, R.A. Vautier, R.I.Manterola, D.A.Urabayen, D.F. Salamone. 1992. Diagnóstico del sexo de fetos bovinos por ultrasonido. *Revista Hereford*, N° 590:37-39, Junio-Julio 1992.
26. Wideman, D., C.G. Dorn y D.C. Kraemer. 1989. Sex detection of the bovine fetus using linear array real-time ultrasonography. *Theriogenology* 31 (1):272.
27. Wilson RD, Weigel KA, Fricke PM, Rutledge JJ, Leibfried-Rutledge ML, Matthews DL, Schutzkus VR. 2005. *In vitro* production of Holstein embryos using sex-sorted sperm and oocytes from selected cull cows. *J Dairy Sci.* 88(2):776-82.