

Artículo de revisión

UTILIZACIÓN DE EMBRIONES COMO ESTRATEGIA PARA MEJORAR LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA DEL GANADO LECHERO

**The use of embryos as a strategy to improve reproductive efficiency in dairy
cattle**

*P. Alvarez Lunardelli¹; L. Rafagnin Marinho¹; C. Bizarro da Silva¹;
C. Oliveira Rosa¹; M. Marcondes Seneda¹.*

¹ *Departamento de Clínicas Veterinarias - Universidad Estatal de Londrina, Londrina, PR, Brasil. CEP
86051-990. Teléfono (43) 3371-4064. Fax (43) 3371-4063.*

Autor para correspondencia: Marcelo Marcondes Seneda (mseneda@uel.br)

RESUMEN

A pesar del aumento en la producción mundial de leche en las últimas décadas, los bajos índices reproductivos de los animales continúan siendo un gran desafío para los criadores. Para obtener mejores índices de productividad es necesario hacer uso de biotecnologías como la producción *in vitro* de embriones (PIVE), que promuevan un mejoramiento genético en el rebaño. Hasta hace pocos años, la PIVE era utilizada como último recurso, cuando las técnicas tradicionales habían fracasado, o solo para el ganado de elite, por el alto costo y bajo aprovechamiento que los procedimientos tenían por la baja disponibilidad de receptoras y por la distancia entre las granjas y laboratorios. Sin embargo, fueran desarrolladas técnicas que hicieron posible el transporte de embriones frescos por largas distancias y la criopreservación de embriones excedentes. Debido a estos avances, América del Sur es actualmente el

líder mundial en la PIVE y la técnica ha crecido exponencialmente en los últimos años debido al uso de animales los de *indicus*, que proporcionan un mayor número de folículos y ovocitos que los de sangre *taurus*. Con la PIVE se puede multiplicar novillas, vacas preñadas o con subfertilidad adquirida, incluso en los veranos más calientes en los que generalmente el ganado sufre de estrés por calor, sin la necesidad de la detección del celo. La técnica también permite una mejor utilización de semen sexado y de alto valor económico y una mayor producción de embriones en comparación con la inseminación artificial y la superovulación / transferencia, lo que proporciona una ganancia genética alta y rápida entre las generaciones de matrices y gran aplicabilidad a las granjas lecheras.

Palabras clave: *bovinos, embriones, eficiencia*

ABSTRACT

Despite the increase in milk global production in recent decades, the low reproductive rates of these animals remain a great challenge for breeders. To improve productivity rates, it is necessary to make use of biotechnologies such as *in vitro* embryo production (IVEP), which promote genetic improvement in the herd. Until recently, the IVEP was used as a last resort, when traditional techniques had failed, or only for a selected group of cattle, because of the high cost and low profiting procedures because of the lack of available recipients and the distance between farms and laboratories. However, the developed techniques made it possible to transport fresh embryos over long distances and to cryopreserve the surplus embryos. Because of these advances, South America is now the world leader in IVEP and this technology has grown exponentially in recent years due to the use of *indicus* animals, which provide a greater number of follicles and oocytes than those of *taurus* blood. With IVEP, heifers, pregnant females or cows with acquired subfertility can be multiplied, even in the hottest summers in which cattle usually suffer from heat stress, without the need for estrus detection. The technique also allows better use of sexed semen and semen of high economic value in addition to greater embryo production compared to artificial insemination and superovulation/transfer, which provides high and fast genetic gain between generations of matrices and high applicability to dairy farms.

Palabras clave: *bovine, embryo, efficiency*

INTRODUCCIÓN

En las últimas tres décadas, la producción mundial de leche bovina se incrementó en más del 50%. Los países en desarrollo han aumentado su cuota de contribución, debido principalmente a un aumento del número de sus rebaños y no a un aumento de la productividad de los animales, ya que la productividad lechera en estos países es restringida por recursos forrajeros de baja calidad,

las enfermedades, el acceso limitado a los mercados y servicios (salud, crédito y capacitación, por ejemplo) y lo bajo potencial genético de los animales lecheros para la producción de leche (FAO, 2014). En este contexto, el uso de las biotecnologías se muestra como una estrategia clave capaz de promover el aumento de la calidad genética y la producción de leche de un rebaño. Para que puedan expresar todo el potencial genético obtenido, es necesario que se elijan las razas adaptadas a las condiciones de la región. Razas lecheras cebuinas como Gir, tienen una rusticidad, que asegura una alta adaptabilidad y productividad bajo condiciones de estrés, tales como las altas temperaturas, los parásitos y lo pasto pobre en nutrientes. El cruzamiento entre las razas Gir y Holstein, originando la Girolanda, representa una opción muy interesante por la asociación de características como la rusticidad en Gir y el gran potencial para la producción de leche en Holstein, que promueve la popularidad de los animales Girolando en Centroamérica y el Sur, y potencialmente en otras áreas tropicales y subtropicales (Pontes *et al.*, 2010).

América del Sur es el líder mundial en la producción *in vitro* de embriones (PIVE) una biotecnología de multiplicación rápida, que ha crecido significativamente en los últimos años (Viana *et al.*, 2012; Marinho *et al.*, 2013) ya que supera las tasas de producción ternero/vaca/año de superovulación (SOV) con transferencia de embriones (TE) (Rumpf, 2007). Un avance notable en PIVE ha ocurrido principalmente en razas cebuinas productoras de leche. El uso de esta biotecnología en Brasil para líneas de corte, como Nelore, mostró una disminución del 24% en el período 2005-2010, mientras que para Gyr, hubo un aumento del 764% en el mismo periodo. El Girolando también tiene una participación importante en PIVE, que representa el 2,5% del total producido en el país (Camargo *et al.*, 2010; Viana *et al.*, 2012). El uso de animales de la sangre *indicus* en PIVE permite obtener un mayor número de ovocitos por aspiración folicular transvaginal o *ovum pick-up* (OPU), proporcionando un mejor rendimiento de embriones por procedimiento de

PIVE y un mayor número de embarazos (Marinho *et al.*, 2013).

A pesar del rápido desarrollo de la tecnología desde su aparición a finales de los años 80, hasta hace pocos años, PIVE era utilizada como último recurso, cuando las técnicas tradicionales habían fracasado. Sin embargo, la alta ganancia genética y productividad y las tasas de embarazo constantes obtenidos en la PIVE, que por lo general resulta en un costo más bajo, han contribuido a hacer de este sistema, la primera opción de elección para los productores (Marinho *et al.*, 2013). En este sentido, el propósito de este artículo es abordar, a través de breve revisión, las principales características de esta técnica que ha logrado cada vez más a escala comercial.

REVISIÓN

Uso estratégico de la PIVE en el ganado lechero

Los avances en la tecnología, las altas ganancias genéticas proporcionadas para los rebaños, las tasas de embarazo más altas y costos más bajos debido a la alta productividad, contribuyeron al aumento del interés de los criadores en el uso de la técnica en las granjas productoras de leche. Como herramienta para la exploración maximizada del potencial genético y reproductivo de la manada, la PIVE tiene alta eficacia en comparación con otros métodos convencionales.

Es posible producir más embriones *in vitro* en comparación con *in vivo* producido por inseminación artificial (IA) y TE, especialmente en las vacas lecheras en el estrés por calor en vacas que a menudo repiten celo (Stewart *et al.*, 2011; Block *et al.*, 2010), además de también poder aplicarse a las novillas prepúberes, vacas en gestación temprana, vacas con subfertilidad adquirida y en mayor frecuencia que la SOV, por ejemplo. Sin embargo, hasta la última década, la falta de receptoras, lo que lleva a la eliminación de los embriones no transferidos excedentes, y las largas distancias entre los laboratorios y las granjas hacían de la aplicación de la técnica a gran escala económica y logísticamente inviable. Por lo tanto,

en los últimos años fueron desarrolladas incubadoras para el transporte de embriones frescos para hasta 2000 km (Pontes *et al.*, 2010) y técnicas para la criopreservación de embriones, permitiendo una aplicabilidad más amplia y luego la dispersión de la PIVE.

Criopreservación

Embriones bovinos producidos *in vitro* (PIV) son más sensibles a la criopreservación que los producidos *in vivo* debido a sus concentraciones más elevadas de lípidos intracelulares (Abe *et al.*, 2002). También se sabe que entre los embriones PIV, los provenientes de vacas *Bos indicus* son menos criotolerantes que los de *Bos taurus*. En este contexto, investigaciones se han realizado con el fin de estudiar el efecto de la exposición de los embriones PIV a agentes lipolíticos antes de la vitrificación, en la supervivencia del embrión, la viabilidad y las tasas de embarazo. Los estudios han demostrado que es posible obtener mayor criotolerancia y tasas de embarazo después de la transferencia de embriones *Bos indicus* producidos en medio de cultivo añadido de forskolin (48,8%) en comparación con los producidos en un medio convencional (18,5%) (Sanches *et al.*, 2011). Investigaciones recientes han demostrado también que los mayores efectos del agente lipolítico se pueden observar en las tasas de embarazo de embriones vitrificados *Bos indicus* (Gyr, 42,67%) en comparación con *Bos taurus* (Holstein, 32,90%) (In Vitro Brasil Ltda., Mogi Mirim, SP, datos no publicados).

El semen sexado

En la cadena lechera, otra herramienta extremadamente ventajosa es la posibilidad de elegir el sexo de la cría, ya que los terneros machos son económicamente indeseables. Cuando no se utiliza el semen sexado, el doble de receptoras es necesario para obtener la cantidad deseada de hembras nacidas. La sexaje por citometría de flujo puede distinguir espermatozoides de cromosomas X o Y con una precisión de más del 90% (Morotti *et al.*, 2014), lo que permite alta tasa de nacimiento de terneras y reposición eficiente de matrices. No obstante, durante este proceso, los

espermatozoides son parcialmente capacitados, lo que resulta en una vida más corta, el deterioro de la fertilidad y de los recuentos espermatozoides de cromosomas fertilización en la dosis (Vázquez *et al.*, 2003).

Sin embargo, con la PIVE es posible optimizar el uso de la dosis de semen, debido a la necesidad de un menor número de células viables por fertilización. Aparentemente cuando las concentraciones de heparina y PHE son apropiados en la fertilización *in vitro* (FIV), no hay ninguna diferencia entre el semen convencional y sexado. Estudios recientes alcanzaron a través de la FIV con semen sexado de toros Gir una tasa de un 45% de blastocistos y 40% de tasa de embarazo (Pontes *et al.*, 2010). Así, mientras una dosis en la IA insemina sólo una vaca, en la PIVE puede inseminar los ovocitos de diez o más hembras con la misma dosis de semen, lo que permite obtener crías del sexo deseado para ampliar el rebaño, el rápida sustitución de genes y crecimiento económico.

El estrés por calor

En las propiedades de las regiones de veranos cálidos y húmedos como América del Sur, el desempeño productivo y reproductivo de vacas lecheras puede ser muy bajo debido al estrés por calor. Y cuanto mayor es la producción de leche de la vaca, más difícil la regulación de la temperatura corporal, intensificando aún más los efectos negativos sobre la reproducción (Hansen, 2007).

Los ovocitos y embriones en desarrollo inicial utilizados en la IA y TE son extremadamente sensibles a las altas temperaturas corporales. Los estudios han demostrado que los embriones de vacas lecheras y sangre *taurus* son más sensibles que las vacas de carne *indicus*, logrando índices más bajos de desarrollo y de blastocistos [Silva *et al.*, 2013]. En estas condiciones, la PIVE se presenta como una alternativa viable para librar los embriones de la exposición al calor excesivo, una vez que el embrión se transfiere a la receptora con 7-8 días de desarrollo, cuando ya no se encuentra en su periodo más sensible (Stewart *et al.*, 2011), representando una herramienta esencial para el

mantenimiento de las tasas de embarazos satisfactorios en el ganado lechero en los meses más cálidos del año.

Selección de hembras donantes

Para la selección de hembras donantes de ovocitos, las vacas deben tener buena genética para la producción de leche y eficiencia reproductiva para la producción de embriones. En vacas Holstein, que normalmente tienen menor población de ovocitos, se puede hacer una pre-selección de hembras que tienen mayor población folicular por ultrasonografía. Es interesante observar que las vacas secas por lo general tienen un mayor número de folículos y ovocitos que hembras lactantes. Las donantes también deben estar libres de enfermedades infecciosas y condiciones de estrés, como los trastornos de la ubre o cascós que pueden generar resultados insatisfactorios (Marinho *et al.*, 2013).

Tipo ideal de receptora

La clave para el éxito de los programas de la PIVE son los factores relacionados con un buen estado nutricional y la salud, así como el manejo reproductivo de las receptoras. Se recomienda el uso de vaquillas vírgenes como la mejor opción para lograr altas tasas de embarazo. Se pensaba que las mejores receptoras eran novillas mestizas, generalmente mestizas de Nelore y una raza europea de alguna capacidad lechera como Simental y Braunvieh. Sin embargo, por la alta demanda y la limitada disponibilidad, estos animales se quedaron escasos y caros para esta función. Se ha propuesto recientemente en Brasil el empleo de hembras Nelore recién-paridas como receptoras de embriones [In Vitro Brasil Ltda., Mogi Mirim, SP, datos no publicados], ya que esta categoría de hembras es la más numerosa y de bajo costo en el país. En contradicción con las ideas preconcebidas, esta alternativa se ha mostrado eficaz con tasas de embarazo de alrededor del 40% y superiores el 10.000 nacimientos de terneros [In Vitro Brasil Ltda., Mogi Mirim, SP, datos no publicados]. Para el uso de esta categoría, en la que hembras son con becerro en el pie, es importante para proporcionar buenas condiciones

nutricionales, de modo que el ciclo estral se puede recomenzar poco después del parto, con el tiempo adecuado para las hembras respondieren a los protocolos de sincronización [Jones y Lamb, 2008]. Si los controles nutricional y sanitario fueren adecuados, el uso de las vacas puede presentar varias ventajas sobre el uso de novillas. En general, las vacas tienen una menor incidencia de distocia y a menudo responden mejor a los protocolos hormonales que novillas que a veces necesitan un protocolo pre-sincronización. Otro aspecto interesante de la utilización de las vacas es que estos animales fueron expuestos a una mayor cantidad de agentes patógenos, teniendo una mayor resistencia a las enfermedades y una mejor calidad del calostro (Marinho *et al.*, 2012).

Estudios realizados en el campo de la epigenética han demostrado que la importancia de la receptora no se limita a su capacidad para responder protocolos de sincronización y mantener la gestación. Existe evidencia de que la calidad de la dieta y el comportamiento materno pueden interferir con la expresión génica del becerro. Ireland *et al.* (2011) observaron que el estado nutricional de la receptora puede interferir con la reserva folicular ovárica los fetos femeninos. Además, se demostró que la baja habilidad materna puede influir en la metilación del ADN de los productos y interferir con la expresión de genes importantes para la adaptación al medio ambiente (Weaver *et al.*, 2004).

Ventajas del uso de embriones producidos in vitro en lugar de los producidos in vivo

Para la producción de embriones in vivo, es necesario realizar la SOV en las hembras donantes, a través de la administración de hormonas exógenas. Con esto, se pueden realizar aproximadamente de 3 a 4 procedimientos antes de hacer un intervalo de 40 a 60 días. Ya la técnica in vitro, además de dispensar la intervención hormonal y permitir el uso de un corto intervalo de 15 a 30 días entre las OPUs de donantes, no tiene límite máximo para el número de punciones. Hay informes de hasta 20 procedimientos realizados secuencialmente, sin dañar a la donante.

Más aún, mientras que la producción de embriones por SOV/TE no puede utilizar hembras embarazadas, la PIVE permite la producción de embriones por medio de punciones de vacas embarazadas (Marinho *et al.*, 2013). Por lo tanto, la mayor productividad de embriones en la PIVE en comparación con la producción in vivo, permite una mayor ganancia genética y una mayor velocidad de su propagación.

En el uso de semen sexado, la capacitación y selección de los espermatozoides en el tracto reproductivo femenino influye directamente en la efectividad de la IA, haciendo de la fertilización *in vivo* un proceso desafiante. En la FIV, por otro lado, se pueden obtener mejores resultados y un mejor aprovechamiento de semen de alto valor económico (Marinho *et al.*, 2013).

Aspectos críticos de la utilización de embriones PIV

La técnica de la PIVE comprende una cantidad de etapas superior a la cantidad necesaria para *in vivo* producción in vivo. Incluye recuperación de ovocitos, la maduración, FIV y cultivo de embriones en condiciones de laboratorio controladas (Nandi *et al.*, 2006). De este modo, para obtener resultados eficientes, es necesario que estos pasos sean realizados por profesionales capacitados. Debido a los costos fijos de los equipos, materiales y personal de laboratorio, la cantidad de embriones producidos determina la viabilidad comercial de la técnica (Marinho *et al.*, 2013).

Como tienen diferencias estructurales de los producidos in vivo, los procesos de criopreservación y de recalentamiento son más críticos para los embriones producidos por PIVE en comparación con SOV/TE (Marinho *et al.*, 2013).

Además, el impacto genético obtenido por PIVE es mayor que en otras técnicas utilizadas. Por lo tanto, la selección de la donante es crucial tanto en el mejoramiento como en el impacto genético negativo en cada generación (Marinho *et al.*, 2013).

Sustitución de la IA por TE

La IA es conocida como la técnica más simple y de bajo costo. Sin embargo, más allá de los resultados insatisfactorios con semen sexado, la necesidad de realizar la detección de celo implica un manejo laborioso, que se hace el principal factor limitante de la popularidad y de los buenos resultados de esta técnica entre las granjas lecheras. Además, al ofrecer mayores tasas de embarazo y acelerar la ganancia genética entre generaciones, muchas granjas lecheras han sustituido por completo la IA por TE (Marinho *et al.*, 2012).

Transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF)

Para facilitar la transferencia de un gran número de embriones de una sola vez, la observación de estro se hace inviable. En los animales *Bos indicus*, en especial, la detección del estro es laboriosa y poco eficiente (Bó *et al.*, 2003). En la TE, así como en la IA, se puede obtener buenos resultados con la sincronización del estro de las hembras por protocolos hormonales (Trigal *et al.*, 2012). La manipulación hormonal tiene como objetivo eliminar la necesidad de la detección del estro y sincronizar la ovulación femenina (Nasser *et al.*, 2004), proporcionando el estado fisiológico ideal para que la receptora albergue un embrión a una hora específica. Las tasas de embarazo obtenidas después de TETF son similares a las obtenidas después de la TE con detección de estro (Bó *et al.*, 2012b). Sin embargo, para que los programas de TETF puedan aplicarse con éxito, factores como nutrición y manejo deben ser observados cuidadosamente.

Protocolos basados en estradiol y progesterona son utilizados comúnmente en América del Sur para la sincronización de la emergencia de la onda folicular y ovulación (Baruselli *et al.*, 2010). Un ejemplo de protocolo es la inserción de un dispositivo liberador de progesterona y la administración de 2 mg de benzoato de estradiol en día aleatorio del ciclo estral (D0). En el octavo día se retira el implante de progesterona, se administra prostaglandina para inducir la luteólisis y 0,5 o 1 mg de cipionato de estradiol para la inducción de la ovulación (Baruselli *et al.*, 2010; 2011). El D10 es

considerado el día del estro y todas las receptoras con un cuerpo lúteo aparentemente funcional son sometidas a la TE en el D17.

La gonadotropina coriónica equina (eCG) se utiliza comúnmente para aumentar las tasas de embarazo de las receptoras. Una dosis de 400 UI se administra en los días 5 y 8 del protocolo de estradiol/progesterona, resultando en un incremento en la proporción de receptoras embarazadas/receptoras tratadas (Looney *et al.*, 2010). Sin embargo, la eCG es capaz de aumentar la proporción de receptores embarazadas cuando su estado nutricional es deficiente, y puede no tener un efecto benéfico en animales mantenidos en buenas condiciones de alimentación (Bó *et al.*, 2012a).

CONCLUSION

La superación de las principales limitaciones de la PIVE como la sensibilidad de los embriones a la criopreservación y las largas distancias entre las granjas y laboratorios, junto con los buenos resultados, sus ventajas y alta aplicabilidad, han cooperado para el uso de la biotecnología a gran escala. Así, en condiciones de buena nutrición y manejo, la PIVE ha beneficiado granjas lecheras incluso en los períodos más calientes del año, y no se encuentra más limitada a los animales de elite, o que no responden a la SOV, sino contribuyendo activamente con la granjas de todos los tamaños y de animales de todas las razas, en el mejoramiento genético y en la rentabilidad de la producción de leche.

REFERENCIAS

- Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos develops in different culture systems using serum-free or serum containing media. *Mol Reprod Dev* 2002; 61:57–66.
- Baruselli PS, Ferreira RM, Sá Filho MF, *et al.* Bovine embryo transfer recipient

- synchronization and management in tropical environments. *Reprod Fert Develop* 2010; 22: 67-74.
- Baruselli PS, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, Sá Filho MF, Martins CM, Rodrigues CA, Bó GA. Timed embryo transfer programs for the management of donor and recipient cows. *Theriogenology* 2011; 76:1583-1593.
 - Bó GA, Baruselli PS, Mapletoft RJ. Increasing pregnancies following synchronization of bovine recipients. *Anim Reprod* 2012a; 9: 312-317.
 - Bó GA, Baruselli PS, Martínez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* 2003; 78:307-326.
 - Bó GA, Peres LC, Cutaia LE, Pincinato D, Baruselli PS, Mapletoft RJ. Treatments for the synchronization of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. *Reprod Fert Develop* 2012b; 24:272-277.
 - Block J, Bonilla L, Hansen PJ. Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. *J Dairy Sci* 2010; 93:5234–5242.
 - Camargo LSA, Freitas C, de Sá WF, Ferreira AM, Serapiao RV, Viana JH. Gestation length, birth weight and offspring gender ratio of *in vitro* produced Gyr (*Bos indicus*) cattle embryos. *Anim Reprod Sci* 2010; 120:10–15.
 - FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Dairy production and products. Milk Production. 2014. Disponible en: <<http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-Production/en/#.U7CjraL0Mgc>>. Acceso en: 29 junio 2014
 - Hansen PJ. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology* 2007; 68:242-249.
 - Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JHL, Mossa F, Lonergan P, Evans ACO. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod Fert Develop* 2011; 23:1-14.
 - Jones AL, Lamb GC. Nutrition, synchronization, and management of beef embryo transfer recipients. *Theriogenology* 2008; 69:107-115.
 - Looney CR, Stutts KJ, Novicke AK, Chiles KC, Tijernia SE, Miranda AR, Romo S, Forrest DW. Advancements in estrus synchronization of Brahman-influenced embryo transfer recipient females. In: Proceedings AETA & CETA/ACTE Joint Convention, Charlotte, NC, USA. Kemptville, ON Canada: CETA/ACTE 2010; 17-22.
 - Marinho LSR, Machado FZ, Seneda MM. Strategies to improve the reproductive efficiency of dairy cattle. In: Hernandez CT. Dairy Cattle: *Reproduction, Nutritional Management and Disease*. New York: Nova Publishers; 2013. p. 127-148.
 - Marinho LSR, Uuntura RM, Morotti F, Moino LL, Rigo AG, Sanches BV, Pontes JHF, Seneda MM. Large-scale programs for recipients of *in vitro*-produced embryos. *Anim Reprod* 2012; 9:323-328.
 - Morotti F, Sanches BV, Pontes JHF, Basso AC, Siqueira ER, Lisboa LA, Seneda MM. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology* 2014; 81:696–701.
 - Nandi S, Kumar VG, Chauhan MS. *In vitro* production of bovine embryos: we need to stop or proceed - a review. *Agr Reviews* 2006; 27:122-129.
 - Nasser LF, Reis EL, Oliveira MA, Bó GA, Baruselli PS. Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo transfer in *Bos indicus* × *Bos taurus* recipients. *Theriogenology* 2004; 62:1577-1584.

- Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TR, 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* 2009; 71:690-697.
- Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GMG, Sanches BV, Porcionato JPF, Vieira PHS, Faifer FS, Sterza FAM, Schenk JL, Seneda MM. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* 2010; 74:1349-1355.
- Rumpf R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. *Rev Bras Zootecn* 2007; 36:229-233.
- Sanches BV, Marinho LSR, Filho BDO, Pontes JHF, Basso AC, Meirinhos MLG, Silva-Santos KC, Ferreira CR, Seneda MM. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology* 2013; 80: 372-377.
- Silva CF, Sartorelli ES, Castilho ACS, Satrapa RA, Puelker RZ, Razza EM, Ticianelli JS, Eduardo HP, Loureiro B, Barros CM. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced *in vitro*. *Theriogenology* 2013; 79:351–357.
- Stewart BM, Block J, Morelli P, Navarette AE, Amstalden M, Bonilla L, Hansen PJ, Bilby TR. Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced *in vitro* with sex-sorted semen. *J Dairy Sci* 2011; 94:3437–3445.
- Trigal B, Gómez E, Caamaño JN, Muñoz M, Moreno J, Carrocera S, Martín D, Díez C. *In vitro* and *in vivo* quality of bovine embryos *in vitro* produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology* 2012; 78:1465–1475.
- Vazquez JM, Martinez EA, Parilla I, Roca J, Gil MA, Vazquez JL. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* 2003; 59:1605–1614.
- Viana JHM, Siqueira LGB, Palhao MP, Camargo LSA. Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. *Anim Reprod* 2012; 9:12-18.
- Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio ACD, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 2004; 7:847-854.