

Capítulo LXXIX

Aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU), Producción *in vitro* de embriones (PIV) y semen sexado en la reproducción bovina

Aitor de Ondiz Sánchez
Salvador Ruiz López

OVUM PICK UP (OPU) Y PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES (PIV) EN GANADERÍA

La técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU, *Ovum Pick-Up*), desarrollada originalmente para la reproducción asistida en la especie humana fue usada por primera vez en ganado vacuno en Holanda al final de la década de los años 80. El empleo de la OPU de forma rutinaria en reproducción asistida veterinaria se inicia en 1994. Se trata de una técnica que puede ser usada en vacas en distintos estados fisiológicos (cíclicas, no cíclicas, durante el primer tercio de la gestación y en aquellas que no responden a estímulos hormonales), en animales viejos con desórdenes reproductivos de origen no genético, y en terneras y novillas prepúberes a partir del 6°-8° mes de edad (Ruiz, 2010) (Fig. 1).

Las grandes expectativas creadas por los procedimientos de producción de embriones *in vivo* se han visto defraudadas con el tiempo. Ello es consecuencia de que su rendimiento no es tan elevado como se suponía en un principio (estabilizado en torno a 4,8 embriones transferibles en la especie bovina), a la existencia de hembras que no responden a los tratamientos para inducir super-

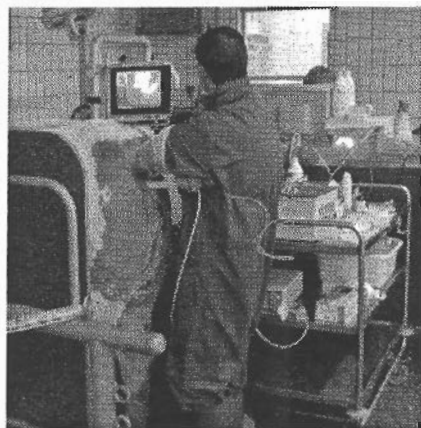


Figura 1. Operador procesando una vaca por OPU.

ovulación, a la necesidad de respetar periodos de descanso entre dos recogidas consecutivas y a la obligatoriedad de que las donantes estén en perfectas condiciones ginecológicas, situación difícil de mantener en hembras multíparas. Estas circunstancias han creado la necesidad de desarrollar un procedimiento alternativo para la producción de embriones: la producción de embriones *in vitro* (PIV) (Herradón *et al.*, 2007) (Fig. 2).

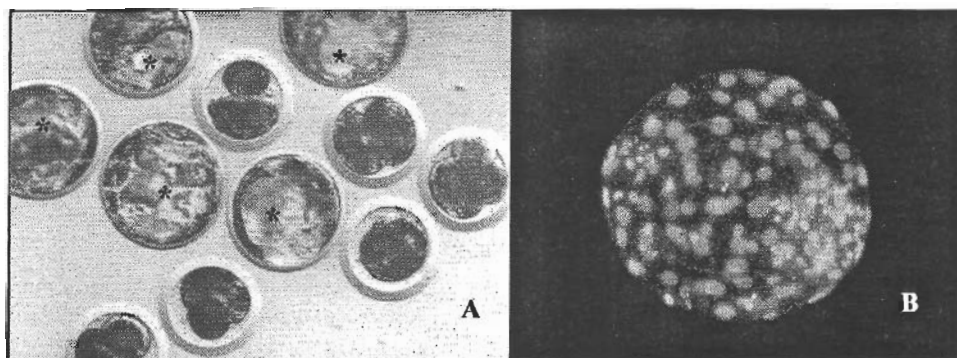


Figura 2. A. Embriones bovinos producidos *in vitro*. Se observan 5 blastocistos de 7-8 días (*) y algunos embriones de desarrollo retrasado (Microscopía de contraste de fases). B. Blastocisto bovino (Microscopía de fluorescencia. Tinción Hoechst 33342).

La OPU supone una alternativa a la PIV de embriones bovinos realizada mediante el empleo de ovocitos procedentes de matadero. En la OPU se trabaja con ovocitos obtenidos de vacas vivas utilizando material genético de origen conocido. Usando esta técnica se consigue producir un mayor número de embriones (hasta 100 embriones al año por vaca) que los obtenidos mediante protocolos estándar de transferencia embrionaria (TE). La aplicación conjunta de ambas tecnologías (OPU/PIV) permite la producción de más de 50 terneros por vaca donante y año (van Wageningen-de Leeuw, 2006). Ambas se convierten en herramientas adecuadas para obtener nacimientos adicionales de hembras donantes de alto valor genético que no pueden ser sometidas a un programa convencional de superovulación. Los datos estadísticos publicados por la *International Embryo Transfer Society (IETS)* indican que durante el año 2006 se obtuvieron 440.000 embriones bovinos a nivel mundial mediante PIV, de los que fueron transferidos unos 290.000, cerca del 66% del total de embriones (Thibier, 2007).

La OPU es una técnica de la cual no se esperan significativos avances en el futuro; sin embargo en la PIV, la mayor comprensión del embrión a través de la aplicación de tecnologías genéticas tales como los *micro-arrays*, puede proporcionar información adicional para el desarrollo de un ambiente *in vitro* semejante al desarrollo embrionario *in vivo*. Esta mejora de los medios de cultivo debe dar lugar a mayores tasas de desarrollo embrionario, así como a un incremento de la calidad y bienestar de los animales nacidos posteriormente (Camargo *et al.*, 2007).

Con la rápida secuenciación del genoma en la especie bovina se identificarán los genes para los rasgos de interés económico los cuales podrá estar disponibles en los

próximos años. La OPU/PIV en este escenario futuro será de gran valor en la multiplicación rápida de genes raros o de *locus* de rasgos cuantitativos (QTL) de alto valor económico. A su debido tiempo, se estima el uso a gran escala de la selección asistida de marcadores o la selección genética asistida (MAS/GAS) en los programas de selección productivos y reproductivos. Además, la OPU, y en particular la PIV, constituyen la base de otras tecnologías más avanzadas como son la clonación y la transgénesis (van Wagtenonk-de Leeuw, 2006).

OPU/PIV EN LA GANADERÍA DEL TRÓPICO

Los bovinos tipo cebú (*Bos indicus*) son animales muy utilizados en los países de zonas tropicales, tanto para la producción de carne como de leche. Los animales *Bos indicus* están bien adaptados a los ambientes tropicales, demuestran una gran tolerancia al calor y por lo general, tienen un mejor desempeño reproductivo en las regiones tropicales y subtropicales que los animales *Bos taurus* (Camargo *et al.*, 2007).

El número de estudios sobre aspiración folicular (OPU) en donantes Cebú es limitado (Coutinho *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2007; Viana *et al.*, 2010). Estas razas difieren considerablemente del *Bos taurus* en dinámica folicular ovárica incluyendo el número de ondas foliculares, la tasa de crecimiento folicular, el tamaño máximo del folículo dominante, la maduración ovocitaria y la expresión génica embrionaria. Por lo tanto, los datos facilitados por razas *Bos taurus* no deben ser extrapolados a animales *Bos indicus* (Camargo *et al.*, 2007, 2010; Torres *et al.*, 2007; Viana *et al.*, 2010).

En un reciente informe (Thibier, 2007) un país de la zona tropical como Brasil, se encuentra clasificado como el segundo en el mundo por el número total de embriones producidos por MOET (Ovulación Múltiple y Transferencia de Embriones), y está en el primer tercio de la lista de los productores de embriones por OPU/PIV. Esto se podría explicar debido al hecho que existe un creciente interés de estos países para adquirir genética superior de animales *Bos indicus* y en particular, de raza Nelore (Pontes *et al.*, 2009). Se ha reportado que las vacas Nelore tienen un mayor número de folículos ováricos en comparación con razas *Bos taurus*, con medias de 18 a 25 ovocitos obtenidos por sesión de OPU, sin empleo de hormonas exógenas o de protocolos de sincronización. En Brasil trabajan actualmente más de 40 laboratorios privados de PIV (Pontes *et al.*, 2009).

En vacas Gyr sometidas a OPU (Viana *et al.*, 2010) se han logrado mejores tasas de recuperación con el empleo una vez por semana de OPU que dos veces por semana ($8,9 \pm 0,8$ vs. $7,0 \pm 0,7$, $P < 0,01$). Se recuperaron más complejos-cúmulo-ovocito (CCOs) grado I en el grupo de OPU dos veces/semana (22,6% vs. 13,3%, $P < 0,01$) pero no se hallaron diferencias en los porcentajes de división embrionaria entre grupos, aunque el porcentaje de embriones en estadio de blastocisto fue mayor en este último (OPU dos veces/semana) (31,8% vs. 21,6%, $P < 0,01$). Las ventajas de la utilización de OPU dos veces/semana compensa la mayor tasa de recuperación de ovocitos en el sistema de OPU una vez/semana, lo que demuestra una mayor capacidad de producción embrionaria. Las repetidas aspiraciones de folículos pueden producir alteración de la dinámica folicular ovárica debido al aumento de la tasa de crecimiento folicular, aunque la presencia de un folículo dominante durante intervalos cortos entre las sesiones

de OPU no afecta a la calidad de los CCOs, excepto cuando está presente un folículo codominante. Esto prueba que las vacas Gyr pueden ser utilizadas como donantes de ovocitos en un sistema OPU/PIV (Camargo *et al.*, 2010; Viana *et al.*, 2010).

En una experiencia llevada a cabo en vacas Nelore en Brasil, en la que se comparaba MOET y OPU/PIV, se recogieron $25,6 \pm 15,3$ ovocitos inmaduros por sesión de OPU. El número de embriones producidos por OPU/PIV ($9,4 \pm 5,3$) fue mayor que en el método MOET ($6,7 \pm 3,7$, $P < 0,05$). Por otra parte, las tasas de preñez después de la transferencia fueron menores en PIV (33,5%, $P < 0,05$) que en embriones derivados de MOET (41,5%); sin embargo, se concluyó que fue posible producir más embriones y gestaciones por OPU/PIV en comparación con MOET (Pontes *et al.*, 2009). Este estudio confirma que la producción de ovocitos es un aspecto único de la raza Nelore (*Bos indicus*), ya que el número de ovocitos/sesión de OPU obtenido en estos animales (25,6) es considerablemente superior a los resultados reportados en diferentes razas bovinas *Bos taurus*, con valores que fluctúan entre 3,9 y 10,6 ovocitos/sesión según diferentes estados reproductivos con y sin pre-estimulación hormonal (Ruiz *et al.*, 2009).

La eficiencia de las tecnologías de embriones resulta dependiente del costo económico que supone la producción de un ternero vivo. Desde un punto de vista comercial, el costo de cada embrión producido por OPU/PIV resulta aproximadamente 1,5 veces mayor en comparación con el método MOET, con exclusión de los costos derivados del semen (Pontes *et al.*, 2009).

El ganado *Bos indicus* ha mostrado un mejor desempeño reproductivo que el *Bos taurus* en regiones tropicales y subtropicales. Esta adaptación puede implicar diferentes mecanismos. Una disminución severa en la calidad de los ovocitos de vacas Holstein se observó en la temporada más cálida en comparación con la temporada fría, mientras que no se detectaron diferencias en los ovocitos obtenidos de vacas Brahman (*Bos indicus*) en distintas estaciones (Rocha *et al.*, 1998). Por otra parte, los linfocitos de vacas Brahman y Senepol fueron menos susceptibles a la apoptosis inducida por el calor (Paula-Lopes *et al.*, 2003), lo que sugiere un mecanismo de protección de las células en animales *Bos indicus*. Algunos de estos mecanismos son proteínas de choque térmico tipo chaperonas (HSP), que promueven la protección celular contra el daño por calor, evitando la desnaturalización de las proteínas y el bloqueo de la apoptosis. La transcripción de estas HSP se incrementa durante el choque térmico, lo que puede ser un indicador de estrés en embriones bovinos (Wrenzycki *et al.*, 2001).

Camargo *et al.* (2007) analizaron y cuantificaron la expresión relativa de la proteína HSP70-1 en ovocitos inmaduros (obtenidos por OPU/PIV) de vacas Holstein y Gyr por PCR en tiempo real después de transcripción inversa. La tasa de división embrionaria fue mayor ($P < 0,05$) para vacas Gyr (66,7%) que en Holstein (53,1%) y la producción de blastocistos fue de 19,6% frente a 10,8%, respectivamente, aunque las tasas de preñez no fueron diferentes estadísticamente después de la transferencia a las receptoras (44,5% para Gyr y 60% para Holstein). Los ovocitos inmaduros Holstein tenían un nivel más alto de expresión relativa de HSP70-1 ($P < 0,05$) ($1,82 \pm 0,22$) que los ovocitos obtenidos de vacas Gyr ($1,12 \pm 0,11$). En conclusión, los ovocitos de vacas Gyr obtenidos en una región tropical fueron menos susceptibles al estrés calórico y más propensos al desarrollo, después de FIV, que los ovocitos Holstein (Camargo *et al.*, 2007).

TECNOLOGÍA DEL SEXADO DE ESPERMATOZOIDES EN EL BOVINO

Desde el nacimiento del primer animal utilizando semen sexado han transcurrido más de 20 años (Johnson *et al.*, 1989) y se ha invertido mucho tiempo y dinero en la mejora y perfeccionamiento de la tecnología del sexaje de espermatozoides. En la actualidad, la separación y clasificación por citometría de flujo (*Beltsville*) sigue siendo el único método válido para la preselección del sexo (Fig. 3) y hasta la fecha, se han producido cientos de miles de crías con semen sexado en una amplia variedad de especies, incluyendo conejos (Johnson *et al.*, 1989), cerdos (Johnson, 1991), bovinos (Cran *et al.*, 1993), ovejas (Catt *et al.*, 1996), équidos (Buchanan *et al.*, 2000), búfalos (Presicce *et al.*, 2005), perros y gatos (de Graaf *et al.*, 2009) y humanos (Levinson *et al.*, 1995).

El uso de la tecnología del sexado de espermatozoides hasta el momento no está exenta de dificultades. Los resultados de fertilidad siguen siendo variables a pesar de su uso comercial durante casi una década, lo que es debido en parte a la reducida esperanza de vida de los espermatozoides después del proceso de selección y de congelación (Rath *et al.*, 2009). Se han reportado factores técnicos y biológicos como los responsables del problema. Éstos incluyen la velocidad de separación de las células X de las células Y, el almacenamiento antes y después del proceso de selección-separación y la posterior calidad de los espermatozoides sexados. Se ha demostrado en estudios *in vitro* que los espermatozoides sexados tienen una disminución de su viabilidad y alteraciones de sus membranas en comparación con espermatozoides no sexados en el verraco (Maxwell & Johnson, 1997). Es posible que esto ocurra debido a que el sexado induce la reacción acrosómica parcial y la capacitación espermática.

En última instancia, estas dificultades se han eludido por el uso de tecnologías que emplean un pequeño número de espermatozoides viables. Hace algunos años se emplearon la inseminación oviductal quirúrgica, los sistemas de FIV y la ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides); sin embargo, con el advenimiento de nuevas máquinas seleccionadoras de alta velocidad y el aumento relativo del número de espermatozoides sexados, se ha orientado hacia la utilización de dosis o pajuelas con bajo número de espermatozoides en IA tradicional (Maxwell *et al.*, 2004). Por otra parte, para satisfacer la demanda económica sólo un 10-15% del número de espermatozoides, comparado con semen no sexado, se cargan en cada pajuela, limitando aún más las posibilidades de fecundación. La separación de espermatozoides X o Y en las poblaciones animales mediante citometría de flujo es una tecnología reproductiva emergente y junto con la determinación del sexo por biopsia embrionaria, represen-



Figura 3. Citómetro de flujo para sexado de espermatozoides, modelo Mo-Flo SX equipado con láser argón (Foto por cortesía Dr. Detlef Rath, Institut für Nutztiergenetik, Friedrich Loeffler Institute (FLI), Mariensee, Alemania).

tan actualmente los métodos más fiables para conseguir descendencia de un sexo determinado (Rath *et al.*, 2009).

El sexado de semen es una técnica prometedora para la industria láctea, porque siempre hay un mercado para el excedente de terneras producidas pero no para el caso de los terneros. Una mayor disponibilidad de novillas lecheras permite a los productores tener un programa genético con una mayor presión de selección, al eliminar aquellas vacas de primer parto con bajo rendimiento y con menor valor genético (Mellado *et al.*, 2010).

Otra ventaja de esta tecnología es la bioseguridad, ya que permite el abastecimiento de novillas de los rebaños propios al aumentar el número de hembras nacidas en la explotación y la posibilidad de disminuir la distocia en vacas de primera lactancia, ya que las terneras son más pequeñas que los terneros machos (de Graaf *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de estas ventajas, las recomendaciones para la aplicación comercial de semen sexado han estado limitadas principalmente al servicio de novillas vírgenes para obtener mejores tasas de concepción que las obtenidas en vacas. De esta manera los productores tendrán un mejor retorno de la inversión al utilizar el semen sexado más costoso que el no sexado. Por otra parte, la reducción en las tasas de concepción con semen sexado produce un mayor intervalo de días vacíos en vacas y una mayor edad al primer parto en novillas, lo cual tiene como desventaja el incremento de los costos de crianza (Garner & Seidel, 2008).

En novillas vírgenes, la fertilidad promedio con semen sexado es de aproximadamente un 70-80% de la obtenida con el mismo semen sin haber sido sometido a sexado, mientras que en vacas se ha reportado una disminución de 12 a 25 % en las tasas de concepción (DeJarnette *et al.*, 2010). En una interesante experiencia usando semen sexado de tres toros con diferente número de espermatozoides por pajuela, se obtuvieron en novillas pertenecientes a 51 rebaños lecheros de EEUU sometidas a 2.125 servicios, tasas de preñez de 46,7, 51,2 y 52,5% para 2,1, 3,5 y 5×10^6 espermatozoides sexados por dosis, respectivamente, en dos de los tres toros sometidos al estudio. En el tercer toro, la tasa de concepción en novillas fue significativamente superior con una media de 59,6% al utilizar 5×10^6 espermatozoides por dosis. El mismo estudio revela en vacas (con 2.369 servicios y 53 rebaños) tasas de preñez de 27,0, 29,1 y 30,3% para 2,1, 3,5 y 5×10^6 espermatozoides. Los autores concluyen que el toro y el número de espermatozoides por dosis no afectan las tasas de concepción en vacas lecheras, pero sí en novillas (DeJarnette *et al.*, 2010). Otros autores difieren de estos resultados y explican este hecho porque disminuye la capacidad fecundante del espermatozoide bovino sexado al inseminar con una baja concentración de espermatozoides (Rath *et al.*, 2009).

Un protocolo para la conservación de espermatozoides de toro, emplea un nuevo protocolo experimental, denominado *Sexcess*® (Rath *et al.*, 2009) que plantea la posibilidad de alargar la vida útil de los espermatozoides sexados bovinos. La motilidad y la integridad del acrosoma incrementan significativamente con este protocolo y los resultados de tasas de concepción en vaquillas con toros probados conservados con *Sexcess*® y con un régimen estándar de IA no difieren de los obtenidos por IA regular. Es importante aclarar que además de las mejoras en la tecnología de selección en sí, se recomienda una pre-selección de los toros para utilizarlos en la producción de semen

sexado. En la actualidad, no existe un método de predicción fiable para determinar si un toro es o no adecuado para un programa de sexado de semen (Rath *et al.*, 2009).

La mayoría de los estudios con semen sexado se han llevado a cabo en ambientes templados, con la diferencia que se han realizado pocos estudios del uso de semen sexado en vacas mestizas en un ambiente tropical (Mellado *et al.*, 2010). En vacas mestizas ubicadas en un área cálida (subtropical húmeda) del oeste de México, se realizaron 649 inseminaciones con semen sexado de toros Gyr (*Bos indicus*) en vacas mestizas (Holstein x Gyr) durante otoño e invierno. El porcentaje de preñez disminuyó significativamente cuando se usó semen sexado contra no sexado (22,7 vs. 37,7%, $P < 0,01$). La temperatura (en el mes más calido, noviembre) produjo una reducción de 21 puntos sobre la tasa de preñez en las vacas de primer servicio, en comparación con las vacas cuya primera inseminación se llevó a cabo en diciembre. El número de servicios por preñez aumentó de manera sustancial ($4,71 \pm 1,35$ vs. $2,13 \pm 2,43$, $P < 0,01$) cuando se asoció con el mes más cálido del periodo del estudio (noviembre), respecto a los meses de invierno. Las tasas de preñez de las vacas (33%) no fueron afectadas por el toro y el protocolo de sincronización del estro, aunque el inseminador si tuvo un efecto significativo ($P < 0,01$). El estudio concluyó que el uso de semen sexado de toros Gyr para inseminar vacas Holstein x Gyr, en la región de referencia, redujo la tasa de preñez en 15 puntos porcentuales con 91% de terneras producidas. También manifiesta que la tasa de preñez depende del inseminador, por lo que la cuidadosa selección de los mismos es necesaria en granjas lecheras comerciales al emplear esta tecnología (Mellado *et al.*, 2010).

La utilización del semen sexado, en las condiciones del estudio, en el programa de IA en vacas no fue eficiente porque la tasa de preñez fue muy baja, por lo que se recomienda, al igual que otros autores, que esta tecnología se limite, al menos por el momento, a su empleo en novillas vírgenes con el fin de tener un mayor éxito en la práctica ganadera comercial (Mellado *et al.*, 2010).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Buchanan BR, Seidel GE, McCue PM, Schenk JL, Herickhoff LA, Squires EL. 2000. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology* 53: 1333.
- Camargo LSA, Viana JHM, Serapiao RV, Guimaraes MFM, Sa WF, Ferreira AM. 2007. Assessment of HSP70-1 transcription levels in immature oocytes from *Bos taurus* and *Bos indicus* cows raised in a tropical climate. *Reprod Fertil Dev* 19: 262.
- Camargo LSA, Freitas C, Sa WF, de Moraes-Ferreira A, Serapiao RV, Viana JHM. 2010. Gestation length, birth weight and offspring gender ratio of *in vitro*-produced Gyr (*Bos indicus*) cattle embryos. *Anim Reprod Sci* 120: 10.
- Catt SL, Catt JW, Gomez MC, Maxwell WMC, Evans G. 1996. Birth of a male lamb derived from an *in vitro* matured oocyte fertilised by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. *Vet Rec* 139: 494.
- Coutinho G, Viana JHM, Sa WF, Camargo LSA, Ferreira AM, Palhao PM, Nogueira LAG. 2007. Ultrasonographic evaluation of follicular dynamics and luteal function in Guzera cows. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59: 1089.

Cran DG, Johnson LA, Miller NG, Cochrane D, Polge C. 1993. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and *in vitro* fertilisation. *Vet Rec* 132: 40.

de Graaf SP, Beilby KH, Underwood SL, Evans G, Maxwell WMC. 2009. Sperm sexing in sheep and cattle: The exception and the rule. *Theriogenology* 71: 89.

DeJarnette JM, McCleary CR, Leach MA, Moreno JF, Nebel RL, Marshall CE. 2010. Effects of 2.1 and 3.5×10^6 sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. *J Dairy Sci* 93: 4079.

Garner DL, Seidel GE Jr. 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 69: 886.

Herradón PG, Quintela LA, Becerra JJ, Ruibal S, Fernández M. 2007. Fecundación *in vitro*: alternativa para la mejora genética en bovinos. *Arch Latinoam Prod Anim* 15: 1.

Johnson LA. 1991. Sex preselection in swine: altered sex-ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X and Y-bearing sperm. *Reprod Domest Anim* 26: 309.

Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. 1989. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol Reprod* 41: 199.

Levinson G, Keyvanfar K, Wu JC, Fugger EF, Fields RA, Harton GL, Palmer FT, Sisson ME, Starr KM, Dennison-Lagos L. 1995. DNA-based X-enriched sperm separation as an adjunct to preimplantation genetic testing for the prevention of X-linked disease. *Hum Reprod* 10: 979.

Maxwell WMC, Johnson LA. 1997. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. *Mol Reprod Dev* 46: 408.

Maxwell WMC, Evans G, Hollinshead FK, Bathgate R, De Graaf SP, Eriksson BM, Gillan LG, Morton KM, O'Brien JK. 2004. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Anim Reprod Sci* 82-83: 79.

Mellado M, Coronel F, Estrada A, Ríos FG. 2010. Fertility in Holstein x Gyr cows in a subtropical environment after insemination with Gyr sex-sorted semen. *Trop Anim Health Prod* 42: 1493.

Paula-Lopes FF, Chase CC, Al-Katanani YM, Krininger CE, Rivera RM, Tekin S, Majewski AC, Ocon OM, Olson TA, Hansen PJ. 2003. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction* 125: 285.

Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. 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.

Presicce GA, Verberckmoes S, Senatore EM, Klinc P, Rath D. 2005. First established pregnancies in Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*) following deposition of sexed spermatozoa near the utero tubal junction. *Reprod Domest Anim* 40: 73.

Ramos AD, Ferreira AD, de Sa WF, Viana JHM, Camargo LSD, Polisseni J, Henry M. 2007. Effect of somatotropin on follicular population, oocyte retrieval and *in vitro* embryo production in Gyr cows. *Rev Bras Zootecn* 36: 380.

Rath D, Moench-Tegeder G, Taylor U, Johnson LA. 2009. Improved quality of sex-sorted sperm: A prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology* 71:22.

Rocha A, Randel RD, Broussard JR, Lim JM, Blair RM, Roussel JD, Godke RA, Hansel W. 1998. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 49: 657.

Ruiz S. 2010. *Ovum Pick Up* (OPU) en bovinos: Aplicaciones en Biotecnología de la Reproducción. *Cría y Salud* 31: 58.

Ruiz S, Zaraza J, De Ondiz A, Rath D. Rendimiento de la OPU en vacas secas no estimuladas para el uso de ovocitos en la producción in vitro de embriones. En, XIII Jornadas sobre Producción Animal (AIDA). 681. Zaragoza, España. Mayo 2009.

Thibier M. 2007. Data Retrieval Committee Report. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increase of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world. *IETS Embryo Transfer Newsletter* 25: 13.

Torres JRS, Pires MFA, Sa WF, Ferreira AM, Viana JHM, Camargo LSA, Ramos AA, Folhadella IM, Polisseni J, Freitas C, Clemente CAA, Sa MF, Martins CM, Bo GA, Baruselli PS. 2007. Effect of maternal heat stress on oocyte quality and *in vitro* competence in *Bos indicus* cattle. *Reprod Fertil Dev* 19: 318.

van Wagtenonk-de Leeuw AM. 2006. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* 65: 914.

Viana JHM, Palhao MP, Siqueira LG, Fonseca JF, Camargo LSA. 2010. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology* 73: 966.

Wrenzycki C, Herrmann D, Keskinetepe L, Martins A, Sirisathien S, Brackett B, Niemann H. 2001. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod* 16: 893.