

Capítulo LXXXI

Retos para la aplicación de la producción *in vitro* de embriones en la Ganadería Doble Propósito

**Hugo Hernández Fonseca
Amaru Pirela**

Actualmente en el mundo se transfiere cerca de un millón (1.000.000) de embriones bovinos, de los cuales aproximadamente 700.000 (70%) son producidos *in vivo* y los restantes 300.000 (30%) son producidos en laboratorios de fecundación *in vitro* (FIV) distribuidos por todo el mundo. Sin embargo, países como Brasil, la Unión Europea y Estados Unidos destacan como sus mayores representantes en los últimos veinte años. Desde el año 2004, Brasil ha pasado a ser el principal productor comercial de embriones *in vitro* en el mundo con una estimación de 250.000 embriones transferidos al año. En este país vecino, donde aunque no se inventó esta tecnología, sin duda se ha optimizado, la mayor parte del mercado de embriones *in vitro* se ha volcado en un 90% a producir animales de las razas zebuinas (Gir Lechero, Brahmán y Guzera).

En Venezuela, existen al menos seis laboratorios de producción *in vitro* de embriones o están próximos al inicio de sus actividades. Los tres primeros pertenecen a las universidades autónomas (UCLA, LUZ y UCV) los cuales han estado dedicados principalmente a las áreas de investigación y extensión. Estos laboratorios constituyen fuentes de conocimiento y de personal preparado, que podrán servir de apoyo a los restantes laboratorios *in vitro*, cuyo propósito es mayormente comercializar. Las asociaciones estratégicas declaradas o no, entre las universidades y el sector privado nacional o extranjero pueden ser sin lugar a dudas de gran ayuda para vencer las dificultades y problemas que en los últimos años hemos encontrado en el establecimiento de la FIV como herramienta para la producción masiva de la mejor genética nacional.

Más allá de resaltados acontecimientos puntuales como el nacimiento de el primer becerro *in vitro* en Venezuela: “Chinco”, el 18 de noviembre del año 2000 (Hda. Sta. Elena, Km. 68 de la vía a Perija, Edo. Zulia, propiedad del Sr. Rafael Pirela) y posteriormente el nacimiento de “Eva” el 3 de Junio del 2007 (Agrop. Paraíso, Edo. Apure) como la primera becerra *in vitro* producto del uso de semen sexado, no hemos podido establecer la FIV como una biotecnología que incida en forma importante en la mermada producción de carne y leche del país (Landinez-Aponte & Hernández-Fonseca, 2008).

En el desarrollo de este Capítulo, tenemos la intención de señalar los aspectos biológicos, técnicos y económicos, así como algunas consideraciones estratégicas que deben ser tomadas en cuenta para dirigirnos hacia la implementación exitosa de la FIV como una tecnología efectiva. Al mismo tiempo, mencionaremos ciertas experiencias que otros países han vivido y como estas pudiesen ser aplicadas al caso venezolano.

ASPECTOS BIOLÓGICOS, TÉCNICOS Y COSTOS

La fecundación *in vitro* como tecnología que lidia con procesos biológicos donde están involucradas células germinales y su interacción, depende altamente de una combinación adecuada de factores y condiciones que determinaran el éxito o no de sus resultados. Al final, es un proceso multifactorial de ensayo-error, cuyos obstáculos deben ser disecados y superados con paciencia, haciendo uso de un cuidadoso registro de los cambios efectuados y de los correspondientes resultados. Lejos de pretender cubrir cada uno de los factores involucrados, a continuación se destacan algunos aspectos biológicos y técnicos, que consideramos importantes a la hora de abordar la aplicación de la FIV en la ganadería de doble propósito:

Raza de los animales

Recientemente, se ha publicado un artículo de notable importancia por la magnitud del número de animales utilizados, el tiempo del ensayo y su realización en un ambiente netamente comercial (Pontes *et al.*, 2010). En esa experiencia, se comprobó la influencia de diversos genotipos (*Bos taurus*, *Bos indicus* y sus cruces) en los resultados de producción de embriones *in vitro*, utilizando ovocitos aspirados transvaginalmente (OPU) y utilizando semen sexado de sementales Holstein y Gir. Los resultados evidenciaron una marcada y favorable diferencia de los ovocitos provenientes de vacas *Bos indicus* (Gir) sobre los animales *Bos taurus* (Holstein). En las limitadas experiencias de nuestro laboratorio, esta inferioridad del genotipo *Bos taurus* se ha evidenciado cuando comparamos el número de ovocitos obtenidos de ovarios de vacas *Bos taurus* con aquel de vacas con predominancia *Bos indicus* (Peláez *et al.* 2011. Comunicación personal)

Pontes *et al.* (2010) igualmente, demostraron que los cruces de *Bos indicus* x *Bos taurus*, sobre todo el ½ sangre Gir x Holstein, eran poseedores de una superioridad aun mayor la del propio genotipo *Bos indicus* (Gir). Esos hallazgos han permitido señalar una serie de ideas que procuran explicar esta superioridad, quizás producto de la heterosis de estos animales. Es posible que la heterosis se exprese simplemente como una mayor relación folículos/ovocitos, una menor tasa de atresia folicular, una mayor duración de la mitosis de ovogonias (Pontes *et al.*, 2010) o como fenómenos de renovación folicular (Johnson *et al.*, 2004; 2005).

Tecnologías asociadas

La FIV busca reproducir masivamente la mejor genética existente y así superar las limitantes ofrecidas por la inseminación artificial y la superovulación en cuanto al número de crías producidas por año. La FIV nos ofrece la posibilidad de obtener has-

ta tanto como 100 crías de una donadora (van Wagtendonk-de Leeuw, 2006), muy superior comparada con las 25 obtenidas por MOET y una obtenida de una misma vaca por año. Es por ello que solo las vacas o novillas más destacadas deben ser usadas como donadoras de ovocitos que ulteriormente serán incorporados a sistemas de producción *in vitro* de embriones. De esta manera es posible sacar el mayor provecho a esta técnica de producción masiva de embriones y contribuir en forma importante a la distribución de los mejores genes productivos.

Para lograr este propósito, necesitamos incorporar a estas hembras seleccionadas a programas de aspiración transvaginal de OPU, ante lo poco práctico de sacrificar estos animales superiores para obtener sus ovarios. A pesar de que la utilización de ovarios de mataderos, disminuyen de forma significativa los costos de los embriones producidos, carece de sentido cuando nos referimos a animales de alto valor genético. Esto impone una asociación obligatoria FIV-OPU si se busca que la fecundación *in vitro* cumpla a cabalidad su propósito y sea exitosamente aceptada a nivel de productores.

En la última década, los resultados de OPU cuantificados en términos del número de ovocitos obtenidos por sesión de aspiración han experimentado mejoras importantes, alcanzando de acuerdo a los genotipos utilizados cifras que superan en promedio los 17 óvulos por sesión y por donadora y que en ocasiones en animales *Bos taurus* × *Bos indicus* superarían los 30 óvulos por sesión (Viana *et al.*, 2004; Pontes *et al.*, 2010). Con frecuencia los extremos superiores de colecta en el número de óvulos superan los 60 óvulos en vacas excepcionales (Mansano-García, 2011. Comunicación personal).

Esta estratégica asociación de la FIV con la OPU, llevó a varios conocedores del área a pronosticar que el número de embriones producidos *in vitro* pronto superará al número de embriones producidos *in vivo* por utilizando la tecnología MOET (Thibier, 2005; Hansen, 2006); todo ello parecía poco probable en los años 80, cuando aun existían problemas para lograr una adecuada maduración de los ovocitos bajo condiciones de laboratorio y cuando era necesario recolectar los óvulos madurados del oviducto, una vez ocurrida la ovulación, a través de métodos quirúrgicos (Brackett *et al.*, 1982).

A esta sólida asociación de tecnologías reproductivas representada por la FIV-OPU en ésta década, se añade comercialmente la utilización de semen sexado, el cual permite predeterminar el sexo de los embriones y por tanto de las crías producidas por FIV. En la actualidad, tanto el semen sexado de sementales *Bos taurus* como de *Bos indicus* ha sido utilizado en programas de producción de embriones *in vitro*, y sus resultados han sido satisfactorios. Por supuesto, una disciplina de laboratorio que incluya la adaptación de las técnicas de lavado, capacitación y manejo del semen de cada semental utilizado debe ser establecida, dada la gran variabilidad individual que suele presentarse entre sementales (Palma & Sinowatz, 2004). A su vez esta diferencia, permitiría seleccionar solo aquellos sementales, genéticamente superiores, que produzcan embriones con una mayor competencia de desarrollo, posterior a su transferencia a las receptoras (Hansen, 2006). Se ha señalado que esta diferencia entre sementales se puede deber a la reacción de cómo sus espermatozoides reaccionan a los factores de capacitación del medio de cultivo o a razones más complejas, aun no probadas, relacionadas a la expresión de genes transmitidos por algunos sementales, que determinan un mejor desarrollo embrionario (Hansen, 2006).

Preparación de personal capacitado

Se ha hecho evidente, que la capacitación técnica del personal de laboratorio y del personal encargado de la recolección de ovocitos a través de OPU, es un factor muy importante en el éxito de una operación, aunque con frecuencia se le ha señalado como uno de los factores más críticos en la operación comercial, tan igual como la calidad del agua ultra pura con la que se preparan los medios de cultivo.

Es necesario un período mínimo de seis meses a un año, el que se requiere para la preparación de un personal adecuado, tanto dentro del laboratorio como el personal de campo. Obviamente, este personal debe cumplir con una serie de prerrequisitos que facilitarían su entrenamiento. Un conocimiento básico de la biología, bioquímica, fisiología reproductiva y de la embriología, siempre constituyen una ventaja, por lo cual, profesionales del área de la medicina veterinaria, biología, medicina humana y aun ingenieros agrónomos con cursos específicos poseen primerísima opción para aprovechar la capacitación ofrecida en el campo biotecnológico, aun cuando su titulación universitaria no es absolutamente excluyente. En el caso particular de los técnicos dedicados a la aspiración de ovocitos, el título de médico veterinario es una condición indispensable y conveniente para lograr un racional aprovechamiento de la técnica y procurar proporcionar atención apropiada a los animales objeto de la técnica.

En trabajos publicados en los últimos años (Hasler *et al.*, 1995; Bousquet *et al.*, 1999), es posible evidenciar que existen tasas de recuperación de ovocitos por donadora y por sesión que probablemente son explicadas por la habilidad de los técnicos aspiradores y debido a que esta capacidad radicaba simplemente en el mayor número de aspiraciones realizadas semanalmente por los aspiradores más eficientes (Pontes, 2010), los cuales realizaban hasta 20 aspiraciones transvaginales de lunes a viernes de cada semana. Un mínimo de dos prácticas semanales (10 animales por sesión práctica) por 6 meses es considerada apropiada por expertos en el área (Mansano-García, 2011. Comunicación personal).

Embriones frescos versus embriones vitrificados

Se ha establecido con claridad que los embriones frescos transferidos a las receptoras suelen producir una mayor tasa de preñez que los embriones criopreservados (Al-Katanani *et al.*, 2002; Mermillod *et al.*, 2006). A pesar del advenimiento de nuevas y más prácticas estrategias de criopreservación como la vitrificación, la cual evade la formación de los dañinos cristales y promueve la formación de un gel vítreo que causa menos daños a las células embrionarias (Cabrera *et al.*, 2011. Comunicación personal), la congelación de los embriones sigue asumiéndose como un mal necesario, en el sentido de que tiende a aminorar la expectativa de preñez. Sin embargo, la congelación o vitrificación de embriones producidos *in vitro* permite planificar mejor en el tiempo las transferencias de los embriones, a la vez que permite su transporte en grandes distancias y preservar por largo tiempo la viabilidad embrionaria. Además, evita la agobiante y costosa tarea de sincronizar un gran número de receptoras con anterioridad al inicio del ciclo de FIV, cuando aún no podemos estar seguros del número de ovocitos recolectados, de la efectividad de la fecundación *in vitro* y del número de embriones transferibles producidos.

En años recientes diversos grupos de investigadores interesados en hacer del sistema OPU-FIV un sistema económicamente aceptable y aplicable, decidieron acortar el cultivo de los embriones en el laboratorio (estadios de mórula o inferiores) y transportarlos a largas distancias y por muchas horas (hasta 72 horas) procurando mantener su temperatura y atmósfera de dióxido de carbono. De esa forma se permitiría que estos embriones continuarán su desarrollo durante el transporte y pudiesen ser transferidos como mórulas o blastocistos una vez arribaran a su destino (O. Watanabe; J. Mansano-García, 2011. Comunicación personal).

Esta innovación fue llevada a la práctica en gran escala (Pontes *et al.*, 2010), logrando obtener una tasa de preñez cercana al 40%, lo cual la hace comercialmente aceptable y abre prometedores caminos para continuar mejorando los medios de transporte de embriones frescos que permitan aun mejores resultados. El futuro probablemente depare la búsqueda no solo de mejores medios de cultivo, diseñados para estimular un apropiado desarrollo embrionario, sino que veremos la salida al mercado de incubadores portátiles (de poco peso y tamaño) diseñados para mejorar aún más las condiciones de temperatura y niveles de dióxido de carbono y oxígeno que rodean al embrión durante el transporte. De alcanzar este objetivo, el transplante de embriones frescos producidos bajo condiciones *in vitro* probablemente aumentará aún más en procura de aprovechar la mayor viabilidad que presentan los embriones frescos con relación a los embriones vitrificados.

Costos de la tecnología

Sin duda, la fecundación *in vitro* es una tecnología costosa y altamente dependiente de la importación de reactivos y materiales, lo cual añade dificultades al proceso técnico, dada las particularidades cambiarias que nuestro país vive actualmente y que sin duda dan pie a precios de insumos elevados bien por la especulación o por los múltiples trámites burocráticos por los que tienen que pasar los importadores. Sin embargo, países como Brasil, Colombia, Uruguay y Argentina, por citar los sudamericanos han podido establecer tanto en el campo comercial como de investigación, laboratorios de FIV exitosos.

A los problemas antes nombrados se agregan limitantes propias de las tecnologías asociadas a la FIV, tales como el costo elevado del semen sexado y el moderado número de ovocitos obtenidos por OPU, sin contar con que en algunos países se debe cancelar una tarifa solo por el derecho a aspirar a determinadas donadoras de alto valor genético. Todo esto por supuesto también va a contribuir a un mayor costo de los embriones producidos *in vitro*, si lo comparamos con la inseminación artificial o con los embriones producidos por superovulación.

Cuando nos referimos a las limitantes propias de la fecundación *in vitro* que incrementan los costos, es obligatorio considerar que parece existir un límite, bajo las condiciones *in vitro*, que no permite que más de 30 a 40% de los ovocitos madurados y fecundados *in vitro* alcancen el estadio de blastocisto (Mermillod *et al.*, 2006). Este bajo límite, unido a una inferior viabilidad embrionaria y menor resistencia a la criopreservación parecen estar relacionados con alteraciones en la expresión genética debido a inadecuados medios de cultivo bajo condiciones *in vitro*, tanto en el caso del ovocito como del embrión. Todo esto contribuye a disminuir la eficiencia de un siste-

ma de cultivo que en el mejor de los casos transforma el 40% de los ovocitos recuperados en embriones transferibles.

Las receptoras de embriones *in vitro*, son en si también una importante limitante, al existir diferencias en la capacidad de las mismas para permitir el desarrollo de los embriones transferidos (McMillan, 1998; Hansen, 2006). Algunas de las limitantes aquí enumeradas y otras adicionales encontrarán sin duda una solución en la medida que más recursos y esfuerzos sean dedicados a las áreas básicas y aplicadas de la investigación científica. Actualmente, grandes intentos se están realizando en hallar respuestas a través del estudio del papel fisiológico que varios factores de crecimiento, como el BMP4, poseen en el desarrollo embrionario (La Rosa *et al.*, 2011).

Afortunadamente, la FIV es una tecnología que sin duda logrará establecerse y ocupará un lugar cada vez más importante en la producción de animales genéticamente superiores. Esta idea se encuentra bien soportada, no solo por el acelerado progreso experimentado en la última década, sino principalmente por su capacidad de producir en forma masiva tantos embriones de una sola donadora. Si consideramos que se pueden producir entre 3,5 y 5 embriones por sesión de aspiración OPU (Pontes *et al.*, 2010), y que esta operación se puede llevar a cabo hasta dos veces por semana (con o sin estimulación hormonal) por varios meses continuos, es fácil deducir que el número de crías producidas de los animales genéticamente superiores del rebaño, será muy superior al producido por cualquier otra tecnología existente, todo lo cual compensa con creces los mayores costos de la FIV. A través de cálculos propios (Hernández-Fonseca & Landinez-Aponte, 2008) y partiendo de 100 vientres, el número de crías hembras producidas por FIV-OPU con semen sexado era siete veces superior al producido por MOET y más de doscientas veces superior al número de crías hembras producidas por IA, también utilizando semen sexado en ambos casos.

IMPORTANCIA DE LAS ASOCIACIONES ESTRATÉGICAS

Las asociaciones estratégicas son definidas como vinculaciones de dos o más personas naturales o jurídicas que buscan beneficios a través de la suma de los recursos de cada ente, lo cual los coloca en situación ventajosa de competencia.

Con el Estado

Es frecuente que el estado implemente políticas de apoyo financiero a biotecnologías con potencial de beneficios a mediano y largo plazo para la ganadería de carne y leche. Este rol de los gobiernos e instituciones multinacionales es de vital importancia, ya que a través del apoyo económico necesario permite que los laboratorios desarrollen las tecnologías hasta un punto donde estas sean aplicables y atractivas a la inversión privada. Tal es el caso de Brasil, donde muchas compañías comerciales se originaron a partir de la adquisición de derechos sobre tecnologías “*Know How*” y medios de cultivos *in vitro* creados en ambientes universitarios.

Un caso similar sucede con un proceso en la actualidad bastante relacionado con la FIV, como es el caso de la tecnología del semen sexado por citometría de flujo, la cual fue desarrollada en el laboratorio de del Departamento de Agricultura de los Es-

tados Unidos de América (EE.UU.). Luego las patentes fueron adquiridas por una compañía privada de capital mixto (XY Inc).

Un aspecto que con frecuencia se pasa por alto en grandes proyectos de apoyo a laboratorios de FIV, es el hecho de que los mismos formen personal especializado, que más allá del número de embriones y preñeces producidas, quedarán para dar apoyo a otros laboratorios. En nuestra experiencia, un laboratorio con el equipamiento básico y un investigador experimentado puede formar de 2 a 3 técnicos de FIV en un periodo de un año.

Con las asociaciones ganaderas

Los ganaderos, productores o criadores organizados son los entes fundamentales en las alianzas estratégicas, no solo porque constituyen las unidades funcionales del tejido productor pecuario, sino porque además son los propietarios del material genético que deseamos reproducir masivamente. Este ente o socio estratégico generalmente se valora más por el acceso al material genético y por la disponibilidad amplia de receptoras, que por su aporte en recurso financieros directos a los proyectos de producción masiva de embriones *in vitro*.

Con la empresa privada

La empresa privada relacionada al sector agropecuario, tales como consorcios del sector lácteo, cárnico o de servicios (centrales de semen, consultores técnicos, etc.) son los llamados a aportar los recursos financieros o bien el apoyo logístico de un emprendimiento de la producción *in vitro* (PIV) de embriones.

A pesar de que es esperado el aporte económico del sector privado para este tipo de emprendimiento biotecnológico, no debemos descartar nunca el apoyo logístico de una empresa del sector agropecuario. Ejemplos concretos de este último punto, lo evidenciamos en países como Colombia, Argentina y Brasil, donde empresas de biotecnologías reproductivas se asocian a centrales de semen, las cuales ya tienen un dominio del mercado regional (estrategias, logística, cartera de clientes y credibilidad), todo lo cual facilita la introducción de nuevas tecnologías como la fecundación *in vitro* (FIV). Además es obvio, que las asociaciones con dichas centrales de semen se complementan extraordinariamente bien con iniciativas de producción *in vitro* de embriones, ya que el suministro y disponibilidad de semen sexado y convencional, preparado a las concentraciones y con los dilutores exigidos por el proceso de FIV constituyen una ventaja competitiva. Si estas asociaciones incorporan centros de acopio de donadoras y receptoras, de manera de contar con una fuente constante de ovocitos colectados por OPU, la asociación se fortalece aun más.

Con las universidades

Las redes académicas y científicas establecidas entre las universidades nacionales e internacionales y los centros de investigación resultan ser uno de los aportes más interesantes con las que las mismas participan en una asociación estratégica. El aporte de las universidades y afines, consiste en colocar a la disposición de las asociaciones recursos humanos altamente especializados capaces de desarrollar o estandarizar tec-

nologías propensas a ser patentadas. Además estas redes garantizan la continua revisión y avance de las tecnologías y la generación de nuevos conocimientos.

Con las comunidades

Los vínculos con las comunidades tienen una importancia solo evidenciable en aquellos momentos cuando la aplicación de las tecnologías y los productos desarrollados con el concurso de las asociaciones estratégicas necesitan de la aprobación gubernamental o social. Preocuparse por llevar a cabo campañas de educación comunitaria, donde se diluciden conceptos y procesos, donde se discutan las repercusiones y beneficios que los productos tecnológicos o el conocimiento generado traen a las comunidades, siempre deberían formar parte de las actividades de las asociaciones estratégicas orientadas a las biotecnologías reproductivas de la ganadería doble propósito.

CONCLUSIONES

En el caso particular de la FIV no existen dudas de que constituye la biotecnología de elección para masificar la multiplicación y distribución del más selecto material genético de la ganadería doble propósito. La FIV combinada con la OPU y con el uso del semen sexado ofrece una alternativa poderosa para la producción de hembras mestizas F1 que podrían contribuir muy significativamente al incremento de la producción lechera nacional. Sin embargo, es necesario superar obstáculos como la capacitación del personal técnico especializado venezolano, la creación de alianzas duraderas entre centros de investigación, empresa privada y gobierno nacional, así como la agilización de importaciones de reactivos necesarios con las preferencias cambiantes correspondientes.

Mucho esfuerzo podríamos ahorrarnos, si aprovechamos las experiencias tan impresionantes de países vecinos, especialmente Brasil, los cuales han logrado gran cantidad de resultados exitosos trabajando con razas *Bos indicus* y sus cruces. En ese sentido, debemos aprovechar las ventajas que nos ofrece la utilización de animales *Bos indicus* o las $\frac{1}{2}$ sangre F1 como fuente de ovocitos conocidos los excelentes resultados que han dado en Brasil, en términos de un mayor número de ovocitos colectados.

De igual manera, debemos orientar nuestras investigaciones hacia la identificación de aquellos sementales que por razones que aún no hemos podido explicar por completo, tienden a generar embriones *in vitro* con una mayor capacidad de desarrollo post-transferencia.

Los esfuerzos iniciales en cualquier programa de FIV deben orientarse a la transferencia preferencial de embriones frescos; sin embargo, los centros de investigación deben proveer alternativas propias para la criopreservación de los mismos.

Como alternativa resulta muy interesante el cultivo de embriones durante su transporte; sin embargo, para lograrlo requerimos de incubadoras portátiles sofisticadas y costosas, poco justificadas si los embriones requieren ser transportados por pocas horas.

Mucho hincapié se ha hecho sobre la necesidad de preparar técnicos venezolanos y en la importancia de generar un conocimiento propio nacional sobre estas bio-

tecnologías. Este conocimiento ha generado la creación de medios de cultivo para las diferentes fases del desarrollo embrionario, así como en la identificación y manejo de los gametos de la hembra y del macho. Algo que es evidente, es el hecho de que el genotipo juega una gran influencia en el desempeño y capacidad de desarrollo embrionario, todo lo cual impone generar y adaptar las tecnologías reproductivas al mestizaje particular de cada región o país. La generación de tecnologías propias y adaptadas al genotipo regional puede no ser la vía más sencilla, pero es la única manera de garantizar la permanencia a largo plazo de los programas biotecnológicos en el país. Normalmente, las tecnologías del “*Know How*” suelen crear dependencias y son costosas por el cobro de regalías, aunque pueden ser aprovechadas siempre y cuando no se descuide el fortalecimiento del aparato local.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Katanani YM, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Krininger III CE, Block J, Thatcher WW, Hansen PJ. 2002. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified *in vitro* produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology* 58 (1): 171.
- Bousquet D, Twagiramungu J, Morin N, Brisson C, Carboneau G, Durocher J. 1999. *In vitro* embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology* 51(1):59.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod* 27: 147.
- Hansen PJ. 2006. Realizing the promise of IVF in cattle-an overview. *Theriogenology* 65 (1): 119.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA. 2003. Production, freezing and transfer of IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43 (1):141.
- Hernández-Fonseca HJ, Landinez-Aponte JA. 2008. Eficiencia de la fecundación *in vitro* y biotecnologías complementarias en la producción de bovinos. En: Manual de Ganadería Doble Propósito. C González-Stagnaro, E Soto-Belloso (eds.). Ediciones Astro Data, S.A. Maracaibo-Venezuela. VIII (1): 283.
- Johnson J, Bagley J, Skaznik-wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Nikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Eorkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT, Tilly JL: 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 122 (2):303.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428 (6979):145.
- La Rosa I, Camargo LSA, Pereira MM, Fernandez-Martin R, Paz DA, Salamone DF. 2011. Effects of boné morphogenic protein 4 (BMP4) and its inhibitor, Noggin, on *in vitro* maturation and culture of bovine preimplantation embryos. *Reprod Biol Endocrinol* 9 (1):18.
- Landinez-Aponte JA, Hernández-Fonseca HJ. 2008. Historia y evolución de las biotecnologías aplicadas a la reproducción. En: Manual de Ganadería Doble Propósito. C González-Stagnaro, E Soto-Belloso (eds.). Ediciones Astro Data, S.A. Maracaibo-Venezuela. VIII (1): 695.

McMillan WH. 1998. Statistical models predicting embryo survival to term in cattle after embryo transfer. *Theriogenology* 50:1053.

Mermillod P, Locatelli Y, Dalbiès-Tran R, Uzbekova S, Baril G, Guignot F, Perreau C, Poulin N, Touzé JL, Pennetier S, Schmaltz B, Cognie Y. 2006. In vitro production of ruminant embryos: Results, limits and perspectives. Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture, Tainan, Taiwan. 7-10 de Noviembre de 2006.

Palma GA, Sinowatz F. 2004. Male and female effects on the in vitro production of bovine embryos. *Anat Histol Embryol* 33: 257.

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. 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.

Thibier M. 2006. Transfers of both in vivo-derived and in vitro produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. *IETS Embryo Transfer Newsletter* 2006 24:11.

Van Wagtendonk-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, Camargo LSA, Ferreira AM, A WF, Fernandes AC, Marques Junior AP. 2004. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Anim Reprod Sci* 84 (1-2):1.