

Artículo de investigación científica y tecnológica

Efecto del grupo genético de vacas de las razas Gyr y Holstein sobre la técnica de producción *in vitro* de embriones bovinos

 Héctor Javier Narváez^{1*}

¹ Universidad de Santander. Bucaramanga, Colombia

* Autor de correspondencia: Universidad de Santander. Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agropecuarias, Programa de Medicina Veterinaria, Grupo de Investigación en Ciencias Agropecuarias – GICA. Campus Universitario Lagos del Cacique. Calle 70 No. 55-210. Edificio Yariguies, 2º piso, sala de docentes. Bucaramanga, Colombia. h.narvaez@mail.udes.edu.co

Recibido: 07 de noviembre de 2019

Aceptado: 26 de febrero de 2020

Publicado: 21 de julio de 2020

Editor temático: José Ángel Gil Perdomo (Universidad Nacional de Colombia)

Para citar este artículo: Narváez, H. J. (2020). Efecto del grupo genético de vacas de las razas Gyr y Holstein sobre la técnica de producción *in vitro* de embriones bovinos. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 21(3), e1697. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1697

Resumen

El objetivo del actual estudio fue evaluar el efecto del grupo genético de donadoras de ovocitos de las razas Gyr y Holstein sobre el desempeño en la técnica de producción *in vitro* de embriones. Se utilizaron 12 vacas multíparas, no lactantes, seis de la raza Gyr (*Bos indicus*) y seis de la raza Holstein (*Bos taurus*). Previo a la aplicación de la técnica de aspiración folicular, los animales fueron sometidos a sincronización del estro, mediante la administración de 3 mg de benzoato de estradiol (RIC-BE®, Tecnopec Ltda., Brasil), más la inserción de un implante auricular de norgestomet (Crestar®, Intervet, Brasil). La aspiración fue realizada siete días después del inicio del protocolo de sincronización. Los resultados determinaron que las vacas de la raza Gyr presentaron mayor número de folículos visualizados y de ovocitos recuperados, así como mayor tasa de clivaje y de blastocistos en el día siete. Estos resultados permiten considerar que la aplicación de la técnica de producción *in vitro* de embriones en la raza Gyr puede presentar mejor desempeño en ciertos parámetros en relación con la Holstein.

Palabras clave: aspiración folicular, *Bos indicus*, *Bos taurus*, desempeño reproductivo, onda folicular

Effect of the genetic group of cows of the Gyr and Holstein breeds on the *in vitro* production technique of bovine embryos

Abstract

The aim of this study was to evaluate the genetic group effect of oocyte donors of the Gyr and Holstein breeds on the performance of the *in vitro* embryo production technique. Twelve multiparous cows were used, non-lactating, six of the Gyr breed (*Bos indicus*), and six of the Holstein (*Bos taurus*) breed. Prior to the implementation of the follicular aspiration technique, the animals were subjected to estrus synchronization through the administration of 3 mg estradiol benzoate (RIC-BE®, Tecnopec Ltda., Brazil) plus the insertion of an ear implant with norgestomet (Crestar®, Intervet, Brazil). Aspiration was performed seven days after the start of the synchronization protocol. The results showed that the cows of the Gyr breed had a higher number of visualized follicles and recovered oocytes, as well as a higher cleavage and blastocyst rate on day 7. These results allow considering that, the application of the *in vitro* embryo production technique in the Gyr breed offers a better performance in specific parameters in comparison to the Holstein breed.

Keywords: *Bos indicus*, *Bos taurus*, follicular aspiration, follicular wave, reproductive performance

Introducción

La utilización de la técnica de aspiración folicular, asociada a la producción *in vitro* de embriones (ovum pick up-*in vitro* embryo production (OPU-PIV)), es una biotecnología altamente difundida en el mundo, que permite aumentar el número de nacimientos por hembra, posibilitando una ganancia genética anual estimada de 2,5 % (Vishwanath, 2003).

Según la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS), en América del Sur fueron producidos, en el 2017, 450.613 embriones por la técnica de producción *in vitro*, consolidándose como la mayor región en el mundo en producción de embriones por dicha técnica (Viana, 2018).

Existen múltiples factores que afectan los buenos resultados de los programas OPU-PIV, como la realización de la técnica en fase aleatoria del ciclo estral, la obtención de ovocitos con diferente grado de madurez (Hendriksen et al., 2000; Vassena et al., 2003), la variabilidad de la respuesta de los animales, así como la de los sistemas de cultivo *in vitro* empleados (Lonergan & Fair, 2008). La influencia de estos factores puede disminuir la competencia de los ovocitos para el desarrollo *in vitro*, afectando la producción y la calidad de los embriones, lo que causa pérdidas del material genético y pérdidas económicas en los programas OPU-PIV (Ealy et al., 2019). Se han desarrollado diversos trabajos con el objetivo de aumentar la eficiencia de la técnica de aspiración folicular asociada a la producción *in vitro* de embriones, a través de la sincronización de la onda de crecimiento folicular junto a la aplicación de gonadotrofinas; con ello, se busca mejorar la tasa de recuperación, la calidad de los ovocitos colectados y el número de embriones producidos (Chaubal et al., 2007; Pfeifer et al., 2009; El-Sherry et al., 2010).

Por esta razón, el objetivo del actual estudio fue evaluar el efecto del grupo genético de donadoras de las razas Gyr y Holstein sobre su desempeño en la aplicación de la técnica de producción de embriones *in vitro*.

Materiales y métodos

Para la ejecución del actual trabajo de investigación fue adoptado el Estatuto Nacional de Protección de los Animales, con la Resolución 008430 de octubre 4 de 1993, y en el cumplimiento con los aspectos mencionados con el Artículo 87 de dicha Resolución. Este estudio fue desarrollado conforme los siguientes criterios: brindar los cuidados adecuados a los animales según su etología; evitar el dolor innecesario, sufrimiento, estrés o lesiones prolongadas; evitar la duplicación o repetición innecesaria de experimentos y reducción al mínimo indispensable del número de animales para garantizar la validez del estudio que se ha de realizar (Garcés & Giraldo, 2012).

Selección de los animales

Fueron seleccionadas 12 vacas (no lactantes y no gestantes) de un grupo de donadoras, siendo seis hembras de la raza Gyr (*Bos indicus*) y seis de la raza Holstein (*Bos taurus*), con edades entre los 3 y los 7 años, con una condición corporal de 3,5 a 4,0 en la escala de 0 a 5 puntos, y tracto reproductivo normal a nivel estructural y funcional.

El estudio fue desarrollado bajo condiciones tropicales, con pasturas a base de *Brachiaria decumbens* Stapf y *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf (Poaceae), con suplementación mineral, agua *ad libitum* y sin suplementación a base de concentrado.

Aspiración folicular guiada por ecografía

Las donadoras fueron localizadas en dos grupos genéticos: Gyr y Holstein. Para la sincronización de la onda folicular se aplicó una dosis 3 mg de benzoato de estradiol (RIC-BE[®], Tecnopec Ltda., Brasil), más la inserción de un implante auricular de norgestomet (Crestar[®], Intervet, Brasil). El procedimiento de OPU fue realizado 7 días después del inicio del protocolo de sincronización, coincidiendo así con el inicio de la emergencia de la primera onda folicular y previo a la formación del folículo dominante. Los implantes auriculares fueron removidos 24 horas más tarde. La aspiración folicular fue realizada en folículos con un diámetro ≥ 3 mm a 5 mm y llevada a cabo con auxilio de una aguja descartable de 20 G (WTA-Vet, Brasil), acoplada a una línea de teflón con presión negativa de 70 mm/Hg. Previamente al procedimiento de aspiración se realizó el conteo de los folículos en ambos ovarios y se utilizó un ecógrafo (Mindray, DP 2200 VET, China), equipado con transductor microconvexo de 7,5 MHz de frecuencia, acoplado a una guía transvaginal para aspiración folicular.

Inmediatamente después de la punción, el líquido folicular fue transferido para un filtro EmCom (Agtech, USA), y adicionado 100 mL de D-PBS para remoción de los coágulos y células. Las estructuras fueron lavadas en TCM 199 tamponado con HEPES (TCM-199; Gibco BRL, Grand Island, NY), más 10 % de suero fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY), 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de piruvato sódico y 83,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de amikacina (Instituto Biochimico, Río de Janeiro, Brasil). Fueron considerados ovocitos viables para maduración *in vitro* los complejos cúmulo-ovocito (CCO) grado I, II y III, clasificados de acuerdo con la cantidad de capas de células del cúmulus y por el aspecto homogéneo del citoplasma. La clasificación de los CCO fue realizada conforme a lo descrito por Sato et al. (1990).

Producción *in vitro* de embriones

Los CCO de cada donadora fueron lavados tres veces en gotas de 100 μL de medio de lavado (TCM 199 suplementado con HEPES (25 mM) y 10 % de SFB) y transferidos separadamente para gotas de 100 μL de medio TCM 199 y suplementado con 10 % de SFB, 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FSH (Folltropin[™], Bioniche Animal Health, Belleville, Canadá), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hCG (Profasi[™], Serono, São Paulo, Brasil), 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estradiol, 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de piruvato sódico, ITS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina - transferrina - selenio) y 83,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de amikacina, cubiertas con aceite mineral estéril (Sigma-Aldrich Co, Estados Unidos). La maduración se realizó por un periodo de 24 horas en una incubadora a 38,5 °C, 5 % de CO₂ en aire atmosférico y 95 % de humedad.

Fue utilizado semen sexado de Gyr y de Holstein de una misma partida en ambas razas con fertilidad conocida. Las pajillas fueron descongeladas a 35 °C durante 30 segundos, y el contenido fue vertido cuidadosamente sobre el gradiente de Mini-Percoll 45/90. La dosis inseminante correspondiente para cada gota fue de $1,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL. El semen de la raza Gyr fue utilizado para la fertilización de los ovocitos de las vacas Holstein, y el semen de Holstein fue usado para la fecundación de los ovocitos de las vacas Gyr. Este protocolo de fertilización fue llevado a cabo con la finalidad de obtener embriones F1.

Después de la maduración, los CCO fueron lavados tres veces en gotas de 100 μL de medio FERT-TALP y transferidos junto con los espermatozoides en gotas de 50 μL de medio FERT-TALP, suplementado con 0,6 % de BSA, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de heparina, 18 μM de penicilamina, 10 μM de hipotaurina, 1,8 μM de epinefrina y cubiertos con aceite mineral estéril. Los CCO permanecieron en cultivo junto con los espermatozoides por un periodo de 18 a 22 horas con las mismas condiciones empleadas en la maduración.

Después del periodo de fertilización, los presuntos cigotos fueron transferidos separadamente por donadora para gotas de 100 μL de medio SOF suplementado con 2,5 % de SFB y 5 mg/mL de BSA recubiertas con aceite mineral estéril por un periodo de 7 días. Tras 72 horas posfecundación, fue removido y sustituido el 50 % del volumen de cada gota de cultivo utilizando el mismo medio de cultivo citado anteriormente. En este momento fue evaluada la tasa de clivaje con la formación de dos células de los embriones en cultivo.

Siete días después de la fertilización fue cuantificada la tasa de blastocisto y evaluada la calidad de los embriones de acuerdo con la clasificación de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (Stringfellow & Givens, 2010).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con ayuda del *software* Analysis and Experimentation Group (SAEG, versión 9.1), a través de la aplicación Sistema para Análisis Estadísticas y Genéticas. Fueron obtenidas las medias y error-estándar y analizados por ANOVA, considerando los efectos del grupo genético y, en los casos en que fue obtenido efecto significativo ($p < 0,05$), fueron comparadas las medias por el test de Tukey.

Resultados y discusión

Conforme a lo observado en la tabla 1, fue posible verificar diferencia ($p < 0,05$) en las variables número de folículos visualizados, número de ovocitos recuperados, tasa de clivaje y número de blastocistos producidos en el día 7.

Tabla 1. Efecto del grupo genético de acuerdo con la aplicación de la técnica de aspiración folicular y producción *in vitro* de embriones en vacas de las razas Gyr y Holstein

Variables	Vacas Gyr (n = 6)	Vacas Holstein (n = 6)	Valor de p
N.º réplicas	6	6	-
N.º folículos visualizados	21,1 ^a ± 0,7	15,7 ^b ± 0,6	0,0002
N.º ovocitos recuperados	12,7 ^a ± 1,1	8,2 ^b ± 0,7	0,0013
Tasa de recuperación (%)	60,1 ± 5,0	52,2 ± 4,4	0,28
Ovocitos grado I (%)	20,3 ± 0,4	22,6 ± 0,3	0,45
Ovocitos grado II (%)	27,2 ± 0,3	23,0 ± 0,3	0,19
Ovocitos grado III (%)	24,6 ± 0,4	19,9 ± 0,3	0,13
Tasa de ovocitos viables (%)	70,8 ± 3,6	67,0 ± 3,7	0,86
Tasa de clivaje (%)	81,8 ^a ± 3,5	68,7 ^b ± 4,5	0,02
N.º blastocistos día 7 (D7)	3,6 ^a ± 0,5	2,1 ^b ± 0,4	0,03
Tasa de blastocisto (%)	40,2 ± 4,7	32,4 ± 5,5	0,28

Nota. Los datos están descritos como media ± ESM; a, b: letras minúsculas distintas en la misma línea difieren entre sí ($p < 0,05$).

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo con estos resultados, fue posible verificar que el número de folículos visualizados fue mayor en las vacas de la raza Gyr ($p = 0,0002$) que en las vacas Holstein ($21,1 \pm 0,7$ vs. $15,7 \pm 0,6$, respectivamente). Los mecanismos asociados a esta característica están relacionados con mayores concentraciones circulantes de IGF-1 e insulina en razas cebuinas (Alvarez et al., 2000). Sales (2011) relató que vacas *B. indicus* presentaron mayores concentraciones de IGF-1 en el líquido folicular, siendo esta característica relacionada con mayor calidad ovocitaria y mejor desarrollo embrionario en las fases iniciales de la técnica. Más recientemente, Mossa et al. (2017) y Tavares et al. (2018) correlacionaron que aquellos animales con alta población folicular presentan niveles elevados de la hormona antimülleriana, siendo sugerido que esta hormona es un factor predictivo de la alta población folicular y fertilidad. Otros relatos de literatura indican que la menor población folicular presentada en las razas *B. taurus* está asociada a las altas tasas de atresia folicular en comparación con hembras *B. indicus* (Silva-Santos et al., 2011).

En un estudio realizado en vacas Gyr, sometidas a una o dos aspiraciones por semana, el número de folículos visualizados en cada sesión de aspiración se mantuvo en rangos de $14,0 \pm 0,3$ a $14,5 \pm 0,3$ (Viana et al., 2004). Carvalho et al. (2008) demostraron que novillas *B. indicus* presentaron mayor número de folículos reclutados ($33,4 \pm 3,2$) en relación con novillas *B. indicus* x *B. taurus* y *B. taurus* ($29,6 \pm 2,5$ y $25,4 \pm 2,5$, respectivamente).

Al llevar a cabo el análisis, fue posible comprobar que el número de ovocitos recuperados en las vacas Gyr fue mayor que en la raza Holstein. Estos resultados son similares a los descritos en la literatura por Galli et al. (2001), Tamassia et al. (2003), Torres-Júnior et al. (2008) y Viana et al. (2004, 2010).

En un estudio realizado en vacas de raza Holstein se recuperaron de media $4,6 \pm 0,2$ ovocitos por sesión de OPU (Tamassia et al., 2003). No obstante, en un estudio posterior realizado en novillas Holstein (Gimenes, 2010), fueron obtenidos resultados divergentes a los observados en el actual trabajo, en el que fueron recuperados $13,8 \pm 1,8$, $16,2 \pm 2,2$ y $16,2 \pm 2,3$ estructuras en los días 1, 3 y 5 después de la emergencia de la onda folicular, respectivamente. De manera similar, Pontes et al. (2010) recuperaron $11,4 \pm 3,9$ ovocitos en promedio en animales del mismo grupo genético. Contrariamente a todos los resultados citados, Dayan (2001) obtuvo mayor número de ovocitos recuperados en vacas de raza Holstein en relación con vacas de la raza Gyr ($8,0 \pm 1,6$ vs. $4,8 \pm 3,5$, respectivamente). El autor relata que la técnica de aspiración folicular fue realizada en día aleatorio del ciclo estral, siendo aspiradas vacas cíclicas y acíclicas.

A pesar de que los resultados obtenidos en cuanto a calidad ovocitaria (grados I, II y III) fueron similares en ambos grupos genéticos, es importante destacar que en el actual estudio fueron considerados los grados II y III de calidad para los procedimientos de la producción *in vitro* de embriones. Estudios recientes han verificado que estas estructuras parecen tener la misma capacidad de desarrollo que los considerados morfológicamente normales (grado I) (Urrego et al., 2015; Velez et al., 2017).

En cuanto al número de ovocitos viables, la raza Gyr presentó valores superiores a las vacas Holstein, diferencia que probablemente sea una característica inherente de las razas *Bos indicus*, dado que, a mayor número de folículos visualizados, mayor puede ser el número de ovocitos de buena calidad recuperados. Estas observaciones del actual estudio coinciden con lo anteriormente descrito por Gimenes (2010) y Pontes et al. (2010).

Con relación a las tasas de clivaje, fueron obtenidos mejores resultados en las vacas Gyr respecto de las vacas Holstein. Estas observaciones pueden estar relacionadas con la calidad ovocitaria y con la capacidad de estas estructuras en presentar una adecuada maduración nuclear y citoplasmática, además de la calidad del semen utilizado. No obstante, Tamassia et al. (2003) relataron que las tasas de clivaje presentan una correlación positiva ($r = 0,39$; $p < 0,01$) respecto de las tasas de blastocistos. Estos relatos son divergentes a los observados en el actual estudio, en donde las altas tasas de clivaje presentadas no influenciaron las tasas de blastocistos obtenidas.

Ya en el número de blastocistos producidos siete días después de la fertilización, las hembras de la raza Gyr presentaron diferencia respecto a las vacas Holstein ($3,6 \pm 0,5$ vs. $2,1 \pm 0,4$, respectivamente). Otros estudios han observado que embriones de razas *B. taurus* presentan mayor estrés térmico en la fase de cultivo *in vitro*, conllevando mayores tasas de apoptosis frente a las razas *B. indicus* (Satrapa, 2011). A pesar de que en el actual estudio los embriones de las vacas Holstein fueron inseminados con toros Gyr, se considera que los ovocitos son más importantes que los espermatozoides en el desarrollo de la termotolerancia (Nabhan et al., 2010). Gimenes (2010) comprobó mejor desempeño de las razas *B. indicus* en la producción *in vitro* de embriones, con respecto a las razas taurinas.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio es posible concluir que vacas de la raza Gyr presentan mejor respuesta en lo referente a número de folículos visualizados, número de ovocitos

recuperados y producción de blastocistos siete días después de la fertilización, al ser comparadas con vacas de la raza Holstein.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Santander por la financiación del estudio y a las ganaderías participantes en el departamento de Santander por facilitar los animales para la ejecución del estudio.

Descargos de responsabilidad

Todos los autores realizaron aportes significativos al documento, están de acuerdo con su publicación y manifiestan que no existen conflictos de interés en este estudio.

Referencias

- Alvarez, P., Spicer, L. J., Chase, C. C., Payton, M. E., Hamilton, T. D., Stewart, R. E., Hammond, A. C., & Wettemann, R. P. (2000). Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *Journal Animal Science*, 78(5), 1291-1302. <https://doi.org/10.2527/2000.7851291x>
- Carvalho, J. B. P., Carvalho, N. A. T., Reis, E. L., Nichi, M., Souza, A. H., & Baruselli, P. S. (2008). Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, 69(2), 167-175. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.035>
- Chaubal, S. A., Ferre, L. B., Molina, J. A., Faber, D. C., Bols, P. E. J., Rezamand, P., Tian, X., & Yang, X. (2007). Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology*, 67(4), 719-728. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.022>
- Dayan, A. (2001). *Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação in vitro* [Tesis de Maestría, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil]. Repositorio Institucional UNESP. https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/98230/dayan_a_me_botfmvz.pdf?sequenc e=1&isAllowed=y
- Ealy, A. D., Wooldridge, L. K., & McCoski, S. R. (2019). Post-transfer consequences of *in vitro*-produced embryos in cattle. *Journal of Animal Science*, 97(6), 2555-2568. <https://doi.org/10.1093/jas/skz116>
- El-Sherry, T. M., Matsui, M., Kida, K., Miyamoto, A., Megahed, G. A., Shehata, S. H., & Miyake, Y.-I. (2010). Ovarian stimulation with follicle-stimulating hormone under increasing or minimal concentration of progesterone in dairy cows. *Theriogenology*, 73(4), 488-495. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.09.031>
- Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., & Lazzari, G. (2001). Embryo production by ovum pick-up from live donors. *Theriogenology*, 55(6), 1341-1357. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00486-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00486-1)
- Garcés, L. F., & Giraldo, C. (2012). Bioética en la experimentación científica con animales: cuestión de reglamentación o de actitud humana. *Revista Lasallista de Investigación*, 9(1), 159-166. <https://www.redalyc.org/pdf/695/69524955012.pdf>
- Gimenes, L. U. (2010). *Taxa de recuperação in vivo e competência in vitro de oócitos bubalinos, zebuínos, e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular* [Tesis de doctorado, Universidade de São Paulo]. Biblioteca Digital de Tesis y Disertaciones de la Universidad de São Paulo. https://teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-20012011-115005/publico/Lindsay_Unno_Gimenes.pdf

- Hendriksen, P. J. M., Vos, P. L. A. M., Steenweg, W. N. M., Bevers, M. M., & Dieleman, S. J. (2000). Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. *Theriogenology*, *53*, 11-20. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00236-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00236-8)
- Loneragan, P., & Fair, T. (2008). In vitro-produced bovine embryos—dealing with the warts. *Theriogenology*, *69*(1), 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.007>
- Mossa, F., Krassel, J., Scheetz, D., Weber, M., Evans, A. C. O., & Ireland, J. J. (2017). Anti-müllerian hormone (AMH) and fertility management in agricultural species. *Reproduction*, *154*(1), 1-31. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0104>
- Nabhan, T., Satrapa, R. A., Simões, R. A. L., Razza, E. M., Puelker, R. Z., Trinca, L. A., & Barros, C. M. (2010). Influence of the breed of bull (*Bos indicus* x *Bos taurus*) in tolerance to heat shock in bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, *22*(1), 302. <https://doi.org/10.1071/RDv22n1Ab291>
- Pfeifer, L. F. M., Sartori, R., Pivato, I., Rumpf, R., Nogueira, G. P., Xavier, E. G., Dionello, N. J., & Corrêa, M. N. (2009). Effect of circulating progesterone on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. *Animal Reproduction*, *6*(3), 473-480. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6071f7783717068b477a/pdf/animreprod-6-3-473.pdf>
- Pontes, J. H. F., Silva, K. C. F., Basso, A. C., Rigo, A. G., Ferreira, C. R., Santos, G. M. G., Sanches, B. V., Porcionato, J. P., Vieira, P. H., Faifer, F. S., Sterza, F. A., Schenk, J. L., & Seneda, M. M. (2010). Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and indicus-taurus dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, *74*(8), 1349-1355. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.004>
- Sales, J. N. S. (2011). *Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas Bos indicus e Bos taurus* [Tesis de Doctorado, Universidade de São Paulo]. Biblioteca Digital de Tesis y Disertaciones de la Universidad de São Paulo. https://teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-10102012-155605/publico/JOSE_NELIO_S_SALES.pdf
- Sato, E., Matsuo, M., & Miyamoto, H. (1990). Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Journal of Animal Science*, *68*(4), 1182-1187. <https://doi.org/10.2527/1990.6841182x>
- Satrapa, R. A. (2011). *Influência dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I e II), seus receptores (IGFR-I e II), proteínas ligantes (IGFBP-2 e 4) e PAPP-A na aquisição de tolerância ao estresse térmico de embriões bovinos (Nelore vs Holandês) produzidos in vitro* [Tesis de Doctorado, Universidade Estadual Paulista]. Repositorio Institucional UNESP. https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/102432/satrapa_ra_dr_botib.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Silva-Santos, K. C., Santos, G. M. G., Siloto, L. S., Hertel, M. F., Andrade, E. R., Rubin, M. I. B., Sturion, L., Melo, F. A., & Seneda, M. M. (2011). Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, *76*(6), 1051-1057. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.008>
- Stringfellow, D. A., & Givens, M. D. (2010). *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. International Embryo Transfer Society Inc.
- Tamassia, M., Heyman, Y., Lavergne, Y., Richard, C., Gelin, V., Renard, J. P., & Chastant-Maillard, S. (2003). Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development *in vitro*. *Reproduction*, *126*(5), 629-637. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260629>
- Tavares, C. J., Oliveira, J. S., Kischel, H., Leite, W. A., Dias, E., Souza, M. B., Mendes, F. A., Nogueira, E., Nogueira, G., & Melo, F. A. (2018). Anti-müllerian hormone (AMH) as a predictor of antral follicle population in heifers. *Animal Reproduction*, *15*(1), 12-16. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-2017-AR887>
- Torres-Júnior, J. R. S., Pires, M. F. A., de Sá, W. F., Ferreira, A. M., Viana, J. H. M., Camargo, L. S. A., Ramos, A., Folhadella, I. M., Polisseni, J., de Freitas, C., Clemente, C. A., de Sá Filho, M. F., Paula-Lopes, F. F., & Baruselli, P. S. (2008). Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, *69*(2), 155-166. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.023>

- Urrego, R., Herrera-Puerta, E., Chavarria, N. A., Camargo, O., Wrenzycki, C., & Rodriguez-Osorio, N. (2015). Follicular progesterone concentrations and messenger RNA expression of MATER and OCT-4 in immature bovine oocytes as predictors of developmental competence. *Theriogenology*, 83(7), 1179-1187. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.024>
- Vassena, R., Mapletoft, R. J., Allodi, S., Singh, J., & Adams, G. P. (2003). Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology*, 60(5), 923-932. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00101-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00101-8)
- Velez, I. C., Chica, A., Urrego, R., Torres, V., Jimenez-Escobar, C., & Zambrano-Varon, J. (2017). Producción in vitro de embriones a partir de complejos cúmulos oocitos tipo II en bovinos *Bos indicus*. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 12(2), 76-87. <http://dx.doi.org/10.21615/cesmvz.12.2.1>
- Viana, J. H. M., De Almeida, L. S., De Moraes, A., De Sa, W. F., De Carvalho, C. A., & De Pinho, A. (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. *Animal Reproduction Science*, 84(1-2), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.002>
- Viana, J. H. M., Palhao, M. P., Siquiera, L. G. B., Fonseca, J. F., & Camargo, L. S. A. (2010). Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology*, 73(7), 966-972. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.025>
- Viana, J. (2018). 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 36(4), 8-25. https://www.iets.org/pdf/Newsletter/Dec18_IETS_Newsletter.pdf
- Vishwanath, R. (2003). Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, 59, 571-584. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01241-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01241-4)