

Capítulo LXV

Eficiencia de la fecundación *in vitro* y biotecnologías complementarias en la producción de bovinos

Hugo Hernández Fonseca, PhD
Julio Landínez Aponte, Ing Agr

INTRODUCCIÓN

La Fecundación *in vitro* (FIV) es un proceso a través del cual el espermatozoide es capaz de unirse y penetrar el óvulo para formar un nuevo individuo bajo condiciones de laboratorio, es decir, fuera del organismo animal (Hernández-Fonseca, 2005) (Figura 1).

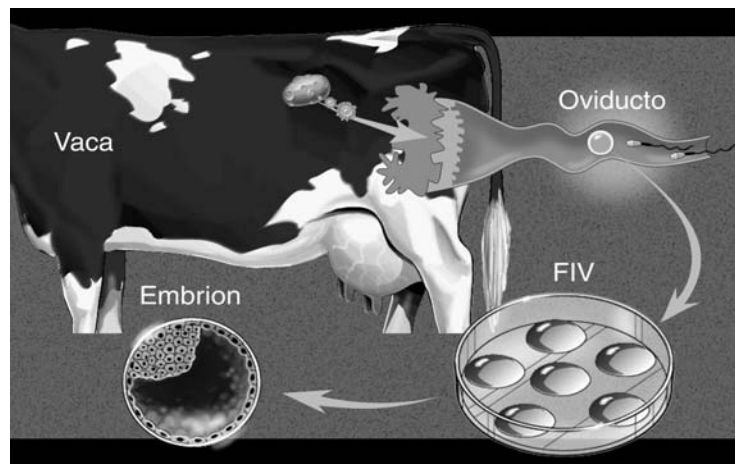


Figura 1. Resumen del Proceso de Fecundación *in vitro*.

La representación busca enfatizar que la FIV simula los procesos fisiológicos que ocurren entre el óvulo y el espermatozoide a nivel del oviducto de la vaca. Además representa el estadio embrionario obtenido al final del proceso de 8 días (Blatocisto).

Diseño del autor (HHF) y creación del Departamento de Audiovisuales de la Universidad de Georgia, Athens, GA, EEUU.

La habilidad de imitar los procesos biológicos bajo condiciones de laboratorio (*in vitro*) nunca ha resultado fácil, en especial, ahora que conocemos tanto sobre el papel que juegan las especies reactivas de oxígeno (ROS del Inglés: Reactive Oxygen Species) en la eficiencia de estos procesos (Álvarez y Storey, 1992; Kasimanickam *et al.*, 2007; Silva y Gadella, 2007; Sakatani *et al.*, 2007). Desde que Benjamín Gaylor Brackett produjo en 1981 a “Virgil” (primer becerro producido *in vitro* en el mundo), son incontables las mejoras que la FIV ha experimentado. Luego se han sumado aplicaciones de otras tecnologías que abren las posibilidades de impactos cada vez mayores a nivel mundial. A lo largo de este capítulo procuraremos ilustrar algunas comparaciones de eficiencia y económicas de la FIV sola o en combinación con algunas tecnologías reproductivas.

APORTE DE LA FIV AL CRECIMIENTO DE LOS REBAÑOS DE GANADO BOVINO

Para el año 2005 ya se habían producido a nivel mundial más de 200.000 becerros por FIV (Hernández-Fonseca *et al.*, 2002; van Wagtendonk-de Leeuw, 2006). Sólo en el año 2005, se produjeron 260.000 embriones por FIV, de los cuales el 70% se transfirieron en fresco. Comparado con los 600.000 embriones producidos *in vivo* por superovulación (Multi Ovulación y Transferencia Embrionaria, MOET), de los cuales la mitad fueron transferidos en fresco (Thibier, 2006), reflejan dos aspectos a considerar. En primer lugar, demuestran el extraordinario crecimiento de la FIV en el mundo (para principios de siglo sólo el 7% de los embriones producidos a nivel mundial provenían de FIV) y en segundo lugar, la inferior calidad y por lo tanto la menor preñez esperada de embriones *in vitro* (Loneragan *et al.*, 2006). Contrario a lo sucedido con la inseminación artificial (IA) y la transferencia nuclear (clonación), la técnica de FIV encontró nichos de desarrollo comercial especialmente fértiles en naciones suramericanas como Brasil, Colombia y Argentina (Nasser *et al.*, 2008). Estos países cuentan con ganaderías puras o mestizas y con un capital humano preparado en las mejores universidades del mundo y que lograron entusiasmar el interés privado para el aprovechamiento de diversas biotecnologías reproductivas. De las biotecnologías que más impacto causaron en el ámbito ganadero están la FIV y la largamente esperada predeterminación del sexo a través del sexaje de semen.

En el caso venezolano, los primeros nacimientos de becerros *in vitro* se produjeron entre los años 1995 y 2006 utilizando embriones importados cultivados *in vivo* en oviducto de oveja bajo la responsabilidad del Dr. Luis Pacheco (comunicación personal); embriones importados y cultivados *in vitro* producidos por el Dr. Hugo Hernández-Fonseca y transferidos por VIATECA (Nava-Trujillo *et al.*, 2005; Socorro *et al.*, 2006). Los primeros nacimientos de embriones producidos en Venezuela y cultivados *in vitro* fueron señalados por el Dr. Andrés Kowalski (comunicación personal). De estos esfuerzos iniciales hasta la fecha han resultado más de 70 crías nacidas (Figura 2).

EFFECTO CONJUNTO DE LA FIV CON OTRAS BIOTECNOLOGÍAS

Hasta el año 2003 (Seidel, 2003) habían nacido más de 200.000 becerros producto de la IA con semen sexado, que es la tecnología más usual aunque no la más eficien-



Figura 2. Fotografía de Toro F1 (Brahmán Rojo-Holstein) producido totalmente *in vitro*, llamado "Chinco"*.

*Nacido en la Hacienda Santa Elena, Propiedad del Sr. Rafael Pírela (padre) y del Ing. Rafael Pírela (hijo), Estado Zulia, Venezuela.

te debido al uso del semen sexado, un costoso insumo. Aunque el sexado de semen por citometría de flujo aun sólo puede sexar 25 de cada 100 espermatozoides procesados (de la cual sólo la mitad, 12,5 son del sexo deseado), constituye una tecnología que goza de exactitud muy superior al 90%. En otras palabras, acierta en el sexo de la cría producida en más de 9 veces por cada 10 preñeces. Aunque los costos de procesamiento de esta tecnología eran bastante altos (hasta 100 \$/pajuela) hace algunos años, las mejoras tecnológicas que permitieron incrementar la velocidad de flujo del procesamiento han disminuido los costos de forma considerable (41\$/pajuela).

Los Programas de reentrenamiento de inseminadores y la agudización de los cuidados en el manejo del semen sexado, inevitablemente maltratado durante su procesamiento (dilución, coloración y velocidad extremas), pueden contribuir a que las tasas de preñez se acerquen al 80% de la preñez logrado con semen convencional, a las cifras encontradas con semen no sexado diez veces más concentrado.

Actualmente es aceptado que el mejor aprovechamiento de la FIV se logra en combinación con otras biotecnologías (Hernández-Fonseca, 2005). Las biotecnologías embrionarias y especialmente la FIV, sola o en combinación con OPU (del Ingles, Ovum Pick Up o Colección Transvaginal de Ovocitos (Nava-Trujillo y Hernández-Fonseca, 2005) y con el semen sexado (Garner y Seidel, 2008, en imprenta) se encuentran en franco crecimiento. Esto se ve reflejado no sólo en la expansión mundial de compañías comerciales que aplican estas tecnologías, sino también en el reporte de Thibier (IETS, 2006) donde reporta que 860.000 embriones fueron transferidos a nivel mundial, de los cuales 260.000 eran embriones *in vitro*.

Considerando todos los factores, lo más eficiente y económico, sobre todo con un costo aun alto del semen sexado, es combinar tecnologías que nos permitan trabajar en forma masiva en la multiplicación de la mejor genética del toro (semen) como del aporte genético de la vaca (ovocitos). De parte del toro, tenemos acceso al semen

congelado de los mejores toros del mundo gracias a la eficiente y estandarizada técnica de congelación del semen. Por el lado de la vaca, poseemos vacas tropicales en nuestro medio, identificadas y registradas, que cuentan no sólo con producciones ideales sino que además son capaces de reproducirse anualmente de manera muy superior a vacas importadas de otros ambientes no tropicales.

Es importante tener acceso a los ovocitos, a través de la OPU o de la recolección en matadero de los ovarios de vacas de alta calidad genética que son sacrificadas por diversas razones como mastitis, problemas pódales, enfermedades crónicas o vejez, etc). Este método de obtención de ovarios a nivel de matadero ha sido ampliamente recomendado en casos donde no es imperativo conocer el origen paternal de la hembra y cuando es aceptable procesar los ovarios de un grupo de hembras del mismo mestizaje o raza (Galli *et al.*, 2003). Estos últimos autores señalan que esta estrategia simplifica el proceso y reduce en forma significativa los costos de producción por embrión. Con estos dos elementos en consideración, podemos lograr la producción masiva de embriones convencionales y sexados utilizando FIV, la cual es una técnica que nos permite masificar la producción y difusión de la mejor genética nacional.

FIV COMO HERRAMIENTA DE PRODUCCIÓN MASIVA DE EMBRIONES SEXADOS

Las razones por las cuales la FIV tiene la capacidad de producir masivamente embriones bovinos, se basan en que en un solo laboratorio de 50 m² y con sólo tres técnicos, se pueden procesar 1000 óvulos por ciclo y se pueden llevar a cabo 2-3 ciclos/semana. Esto quiere decir entre 2000 y 3000 óvulos por semana. Si consideramos que entre 20 a 40 de estos óvulos deben transformarse en blastocistos, esto significa que al menos podrían producirse 400 embriones/semana. Se ha establecido que en términos de número de crías que pueden ser producidas por vaca al año, usando IA una vaca puede producir una becerro al año, pero utilizando MOET, una vaca puede producir 20-25 crías/año, mientras que utilizando la combinación de OPU/FIV, esa misma vaca puede producir entre 80 a 100 crías/año (van Wagtendonk-de Leeuw, 2006). Ninguna otra tecnología o su combinación es capaz de producir semejante cantidad de descendientes.

Esta consideración toma aun más relevancia cuando las metas en la empresa agropecuaria es producir crías de un sexo determinado en cortos periodos de tiempo y cuando el diferencial económico entre crías al nacimiento, destete o como animal maduro supera los 100 \$. De acuerdo con Seidel, dependiendo del nivel de eficiencia con que se utilice el semen sexado en la IA y restando los costos adicionales que trae el uso de semen sexado con la IA (30\$), los incrementos netos del valor de la cría podrían oscilar alrededor de los 110 \$. Tomando en cuenta los precios de venta oficial de las últimas subastas de ASOCEBU, las diferencias entre el valor de venta de hembras y machos F1 superan los 1000 \$, a favor de las hembras jóvenes. Esta situación crea condiciones envidiables para la aplicación de biotecnologías que modifiquen la proporción de sexos a favor del sexo de mayor valor comercial o utilidad.

ESTRATEGIAS PARA ENFRENTAR LA FALTA DE VIENTRES BOVINOS CON EL USO DE LA BIOTECNOLOGÍA

Sin la incorporación y asistencia de estas tecnologías reproductivas no podremos llegar a las cifras esperadas de vientres que garanticen nuestra seguridad agroalimentaria en periodos relativamente cortos. De manera, que la aplicación de las mismas se convierte en un interesante reto para los productores, extensionistas, gremios, políticos e investigadores del país. Probablemente, debemos comprender que la aplicación de cada tecnología dependerá de las condiciones de la zona, características del productor, nivel gerencial de la empresa agropecuaria, tipo de animal deseado y las particularidades del mercado.

Si el objetivo de la industria ganadera nacional es obtener un mayor número de hembras de reemplazo, la mejor estrategia es la adopción total o parcial de la FIV con semen sexado, bien sea con ovocitos obtenidos de hembras vivas selectas o de hembras de matadero. Las ventajas de la FIV se basan en que no existe otra estrategia tecnológica que permita una elevada producción de crías hembras. Por supuesto, existen otras propuestas intermedias y probablemente mucho más factibles, que ofrecen soluciones al número de vientres a largo plazo pero que hacen un uso más amplio de todas las tecnologías y de los recursos disponibles, acordes con nuestras realidades, idiosincrasia y sistemas de producción. Estas propuestas incluirían:

1. Inseminar sólo una vez a las novillas mestizas con semen sexado, sin asumir los costos adicionales de posteriores inseminaciones con este costoso recurso. Las novillas que no resultasen preñadas serían inseminadas por estrategias menos costosas y/o más eficientes como la monta natural o IA con semen convencional o embriones en épocas de estrés calórico. Este estrategia es derivada del esquema del “pájaro temprano” (del Inglés: “early bird strategy”) (Weigel, 2004).

2. Aprovechar las ventajas económicas y raciales de la colecta a nivel de matadero de ovarios provenientes de hembras de grupos raciales definidos (predominante *B. taurus* o predominante *B. indicus*) aunque no individualmente identificadas. Esta estrategia es conocida como parte del esquema de la “donadora anónima” (Weigel, 2004) (Figura 3), permitirá abaratar los costos de producción *in vitro* de embriones, además de que simplificaría los procesos, permitiendo la oferta de embriones a menores costos. Esta estrategia complementaria se podría adoptarla en zonas agropecuarias donde la mejora genética se apoyara principalmente en las virtudes del semen utilizado, bien sea sexado o no. Esta estrategia, podría ser utilizada en ambientes como la zona norte del Estado Zulia, donde predominan animales acebuados, donde el carácter lechero podría ser aportado por toros de razas lecheras; de esa manera se aprovecharía las ventajas de adaptación ambiental aportados por las hembras sacrificadas. Esto daría por resultado animales equilibrados racialmente, adaptados y menos exigentes que constituirían un progreso genético para la región; estos animales podrían constituir el eslabón intermedio que soportaría mejoras genéticas ulteriores en espera de mejoras integrales de otros aspectos del sistema de producción (instalaciones, nutrición, ambiente, sanidad, manejo, precios).

En 10-15% de las mejores vacas de la zona, identificadas previamente a través de los registros de asociaciones nacionales, podría utilizarse sólo MOET en zonas de di-

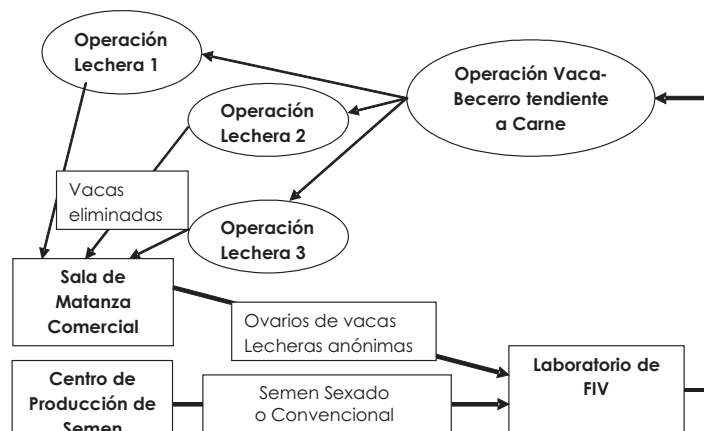


Figura 3. Esquema diagramático de la estrategia de la “Donadora Anónima”. Tomado y modificado de Weigel, 2004.

fácil acceso o lejanas a los laboratorios de FIV (≥ 6 h del Laboratorio de FIV) y sólo utilizando semen convencional para garantizar la producción de embriones a bajo costo. Una alternativa para estas zonas sería utilizar embriones FIV vitrificados (Martínez *et al.*, 2002) en no más de 30% de las receptoras. Para las zonas cercanas a los Laboratorios de FIV y con una elevada proporción de vacas selectas se implementarían programas de aspiración transvaginal u OPU de estas vacas o novillas. Estos ovocitos serían llevados al laboratorio y fecundados sólo con semen sexado de toros selectos. No menos de 60-70% de los embriones resultantes serían transferidos en fresco en explotaciones preseleccionadas donde las receptoras sincronizadas, de menor valor genético, recibirán uno (novillas) o dos (vacas) embriones del mismo sexo de acuerdo a la disponibilidad. A pesar que la OPU es un ejercicio tecnológico que requiere personal especializado y equipos delicados, es importante porque reporta beneficios en términos de obtener y difundir la mejor genética nacional, aportada por la hembra. En nuestro medio latinoamericano y dado el alto componente de animales *Bos indicus*, existen ventajas biológicas inesperadas que benefician la utilización de la OPU. Entre estas ventajas se cuenta una mayor sensibilidad del *Bos indicus* a la estimulación con Hormona Folículo Estimulante (FSH) y un mayor número de folículos por onda de crecimiento, todo lo cual favorece la colección de un mayor número de ovocitos por sesión de aspiración (Bo *et al.*, 2003).

COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS Y SUS COMBINACIONES

Las consideraciones citadas en los párrafos anteriores son válidas sólo cuando comparamos el uso de la IA con y sin semen sexado de un mismo animal. Ahora bien estas cifras que reflejan la realidad de algunos nichos estadounidenses, sin duda difieren de la realidad tropical, por lo que se debe procurar, bajo ciertas premisas locales, establecer posibles márgenes de ganancia productiva (número de embriones y preñeces) y económica al comparar las diversas tecnologías o sus combinaciones en Cuadro 1.

Cuadro 1
Comparación entre diferentes Biotecnologías de Reproducción Asistida
empleadas en la ganadería bovina

Tecnologías	Monta	I. A		MOET		FIV		OPU-FIV
	Natural	NSS	SS	NSS	SS	NSS	SS	SS
No. Vientres	100	100	100	100	100	100	100	100
No. Pajuelas	-	180	180	600	600	210	210	210
No. Embriones	-	90	45	3600	1800	25000	25000	25000
Preñez	70	65	33	1980	990	10000	10000	10000
Crías	50	55	28	1782	891	7000	7000	7000
Hembras	33	28	25	891	802	3500	6300	6300
Ingreso Bruto MM	132	112	100	3.564	3.208	14.000	25.200	25.200
Costo Tecnología \$	CT	C IA		50	54,14	118,26	122,4	122,4

NSS: Sin Semen Sexado; SS: Semen Sexado; CT: Costo Toro; C IA: Costo de Inseminación Artificial; MM: Millones

Cálculos propios de los autores, no publicados.

Este cuadro muestra una comparación cuantitativa entre las diversas biotecnologías reproductivas que pueden ser utilizadas cuando se requiere multiplicar la mejor genética disponible. Partiendo de la base de 100 hembras selectas, se cuantifica el número de pajuelas y su condición (sexado o no sexado) y se calcula, en base a parámetros reproductivos característicos del ganado DP local, la producción *in vivo* o *in vitro* de embriones, preñeces resultantes y crías nacidas con cada una de las tecnologías utilizadas. También se observa el potencial para la producción de hembras de reemplazo de cada tecnología o combinación de estas con la utilización de semen sexado. Esto permite diferenciar el potencial de cada combinación tecnológica, sus costos e ingresos generados por número de hembras producidas/año.

IMPACTO DE LA APLICACIÓN DE FIV Y SU COMBINACIÓN CON OTRAS BIOTECNOLOGÍAS SOBRE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y PRODUCCIÓN DE LAS VACAS

En cuanto al número de hembras producidas por año se observa que incrementa directamente proporcional conforme avanzamos hacia tecnologías de última generación. Así vemos, como el número de hembras producidas por MOET supera con mucho la capacidad de generación de hembras producidas por IA. De la misma manera, la cantidad de hembras producidas con 100 donadoras a través de MOET no llega a 1000. Sin embargo, la utilización de FIV con o sin semen sexado, cuadruplica o sextuplica la producción potencial de crías hembras.

Algo común que encontramos en el análisis del Cuadro 1, es que independiente de la tecnología utilizada, la combinación de las tecnologías con semen sexado incidirá en una mayor proporción de crías hembras nacidas. Ello se realiza a expensas de las tasas de preñez esperadas que generalmente no superan el 40 %, comparadas con tasas de preñez que superan el 50% utilizando semen convencional (Weigel, 2004). Este autor justifica el uso de semen sexado a un costo de 50\$ por pajuela de semen aun con ta-

tas de preñez tan bajas como 35%, al menos bajo condiciones del mercado norteamericano. Bajo condiciones experimentales, investigadores de Colorado (EEUU) han reportado tasas de preñez comparables a controles inseminados con semen no sexado. Amann (1999) sugiere que el beneficio añadido por la utilización de semen sexado debe al menos duplicar el costo ocasionado por el uso de esta tecnología, cosa que no parece cumplirse en éste análisis Cuadro 1) cuando el semen sexado es usado en combinación con la IA. Sin embargo, éste análisis sólo cuantifica los ingresos brutos en base al número de crías hembras logradas y no cuantifica los mayores valores económicos resultantes del mayor valor genético de los toros a los cuales se les practica sexaje de semen.

Si fijamos nuestra atención en las tres variaciones de la FIV (NSS-FIV, SS-FIV y SS-FIV-OPU) observamos como el semen sexado permite casi duplicar el número de hembras nacidas sin mayores alteraciones en el número de blastocistos y de preñeces logradas (Kowalski, 2007. Comunicación personal). Otros autores (Wilson *et al.*, 2006), trabajando con donadoras y semen sexado de toros Holstein encontraron que la tasa de desarrollo de blastocistos producidos difería cuando se utilizaba semen sexado (12,2%) comparado con semen convencional (20,1%). Sin embargo, este impacto negativo del semen sexado sobre la habilidad del embrión para desarrollarse no ha podido ser verificado *in vivo*, dado que el equipo de Wilson no pudo transferir los embriones no sexados debido a la negativa de los productores.

IMPACTO ECONÓMICO DE LA APLICACIÓN DE FIV Y SU COMBINACIÓN CON OTRAS BIOTECNOLOGÍAS EN GANADO BOVINO

El comportamiento de los potenciales ingresos económicos producidos por la venta de las hembras sigue el mismo patrón del número de hembras producidas por cada tecnología. En este punto sería importante destacar que el posible impacto económico del que gozarían las explotaciones que asumen las nuevas biotecnologías es el progreso genético que se traduciría en una mayor cantidad de leche y carne producida.

Donde podemos visualizar un patrón algo diferente al mostrado por el número de hembras producidas y los ingresos producidos, es en el nivel de los costos de las diferentes tecnologías. Al comparar las tecnologías productoras de embriones (MOET, FIV y OPU-FIV) se nota de que los costos de la tecnología de FIV con semen convencional son sólo dos veces mayor que los costos de MOET, sin embargo, los ingresos generados por esta tecnología son al menos cuatro veces mayor que los generados por MOET. Al comparar MOET y FIV, se puede apreciar que los costos generados por la FIV-OPU con semen sexado sólo cuesta 2,5 veces más que MOET y sin embargo produce 7,5 mas hembras y 22 mil millones de bolívares más que esta última. Estas observaciones cumplen con la condición establecida por Amman (1999), quien sugirió que el beneficio agregado resultante de la utilización del semen sexado debe ser al menos el doble del costo tecnológico agregado. Eso sin cuantificar el progreso genético y comercial que resultaría de la posibilidad de la manipulación de los gametos de la vaca, del toro y del sexo de la cría.

Si comparamos que por monta natural sólo se obtendrían 30 hembras por cada 100 donadoras selectas/año; mientras que por MOET incluso con semen sexado no se

superan las 900 crías hembra/año, es evidente que estas cifras son significativamente inferiores a las 3500 a 6300 crías hembras que pueden ser producidas por FIV-SS. Este marcado incremento en el número de crías aun cuando se obtienen con un costo tecnológico mayor (122,4 \$/cría hembra) señalan ingresos brutos por año por cada 100 donadoras que superan los 25.000.000,00 BsF), ingresos muy superiores a los que podrían generarse por monta natural o IA, los cuales apenas superarían los 100.000 BsF.

CONCLUSIONES

En el presente capítulo hemos planteado diversos puntos comparativos de las varias biotecnologías reproductivas actualmente en aplicación a nivel mundial para el mejoramiento de la ganadería bovina. Muchas de estas biotecnologías están en estado muy inicial o en desarrollo en nuestro país. Sin embargo, existen laboratorios y empresas nacionales y extranjeras que han introducido las tecnologías o sus productos a la realidad ganadera venezolana.

De las biotecnologías examinadas, la FIV surge con obvias ventajas para el caso de países en desarrollo como Venezuela, en donde existe un marcado déficit de vientres vacunos que según declaraciones oficiales superan con mucho las 100.000 hembras. Bajo esta situación, es la FIV en combinación con la utilización de semen sexado y opcionalmente la OPU con fines de mejoramiento genético adicional, es la única estrategia tecnológica que puede proporcionarnos en forma acelerada el número de hembras que necesita el país para superar en corto tiempo el déficit de leche que actualmente sufrimos.

Aunque la FIV y sus combinaciones tienen un costo tecnológico importante, estos costos se ven ampliamente abrumados por los ingresos producto del mayor número de hembras producidas y adicionalmente por su mejora genética.

LITERATURA CITADA

- Alvarez JG, Storey BT. 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 13:232-241.
- Amann RP. 1999. Issues affecting commercialization of sexed sperm. *Theriogenology* 52:1441-1457.
- Bo GA, Baruselli PS, Martinez MF. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* 78:307-326.
- Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59:599-616.
- Garner DL, Seidel GE. 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* article in press, corrected proof, Sciencedirect.com.
- Hernandez-Fonseca HJ. 2005. Fecundación *in vitro*. En, Manual de Ganadería Doble Propósito. C González-Stagnaro, E Soto-Belloso (eds). Ediciones Astro Data, S.A. Maracaibo-Venezuela VIII (4):615-619.
- Hernandez-Fonseca HJ, Sirisathien S, Bosch P, Cho HS, Lott JD, Hawkins LL, Hollett RB, Coley SL, Brackett BG. 2002. Offspring resulting from direct transfer of cryopreser-

- ved bovine embryos produced *in vitro* in chemically defined media. *Anim Reprod Sci* 69:151-158.
- Kasimanickam R, Kasimanickam V, Thatcher CD, Nebel RL, Cassell BG. 2007. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology* 67:1004-1012.
- Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans AC. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65:137-152.
- Martínez AG, Valcarcel A, de las Heras MA, de Matos DG, Furnus C, Brogliatti G. 2002. Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Anim Reprod Sci* 73:11-21.
- Nasser LF, Rezende LF, Bo GA, Barth A. 2008. Induction of parturition in Zebu-cross recipients carrying *in vitro*-produced *Bos indicus* embryos. *Theriogenology* 69:116-123.
- Nava-Trujillo HA, Hernandez-Fonseca HJ. 2005. Aspiración folicular transvaginal. En, *Manual de Ganadería Doble Propósito*. C González-Stagnaro, E Soto-Belloso (eds). Ediciones Astro Data, S.A. Maracaibo, Venezuela VIII (3):611-614.
- Nava-Trujillo HA, de Ondiz A, Soto E, Velarde J, Hernandez-Fonseca H, Brackett BG. 2005. Calves born under tropical conditions after direct transfer of cryopreserved *in vitro* produced embryos. *Revista Científica FCV-LUZ XV*(5):429-436.
- Sakatani M, Suda I, Oki T, Kobayashi S, Kobayashi S, Takahashi M. 2007. Effects of purple sweet potato anthocyanins on development and intracellular redox status of bovine preimplantation embryos exposed to heat shock. *J Reprod Dev* 53:605-614.
- Silva PF, Gadella BM, Colenbrander B, Roelen BA. 2007. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. *Theriogenology* 67:609-619.
- Socorro CC. 2006. Análisis de las tasas de preñez en vaquillas mestizas sometidas a transferencia de embriones producidos *in vitro*. Tesis. Especialidad en Reproducción Bovina. Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias
- Thibier M. 2006. IETS (International Embryo Transfer Society). Data retrieval committee annual report. *Embryo Transfer Newsletter* 24:12-18.
- 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* 65:914-925
- Weigel KA. 2004. Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. *J Dairy Sci* 87(E. Suppl.): E120-E130.
- Wilson RD, Fricke PM, Leibfried-Rutledge ML, Rutledge JJ, Syverson Penfield CM, Weigel KA. 2006. *In vitro* production of bovine embryos using sex-sorted sperm. *Theriogenology* 65:1007-1015.