



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Veterinarias

Corrientes - Argentina

**TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN**

**MÓDULO DE INTENSIFICACIÓN PRÁCTICA**

**OPCIÓN:** PRODUCCIÓN ANIMAL

**TEMA:** Influencia del semen bovino de las razas Brahmán, Braford y Brangus sobre la producción *in vitro* de embriones.

**TUTOR EXTERNO:** Trevisán, José Gaspar.

**TUTOR INTERNO:** Konrad, José Luis.

**RESIDENTE:** Romero, Pablo Sebastián.

**E-mail:** psromero618@gmail.com

## **ÍNDICE**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>7</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>10</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>10</b>

## RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar cómo influye la partida de semen en la producción *in vitro* de embriones, cuantificando la tasa de clivaje y embriones logrados sobre el total de ovocitos madurados en las razas Braford, Brahmán y Brangus. El trabajo se realizó en el laboratorio OVOX IN VITRO SRL del MV Trevisán, José Gaspar que se dedica a la producción y transferencia de embriones logrados por la técnica de fertilización *in vitro*, ubicado en la ciudad de Corrientes Capital. Se trabajó con semen congelado de distintos centros genéticos del país aportado por las cabañas, ovocitos recuperados mediante OPU, y con la información obtenida de la planilla de producción de embriones del laboratorio en las cuales se contabilizó un total de 705 aspiraciones de hembras donadoras de ovocitos, 205 pertenecientes a la raza Braford, 365 a la raza Brangus y 135 a la raza Brahmán. La tasa media de clivaje y producción de embriones obtenida fue de 69,71% y 27,39 %. En cuanto a la producción de embriones por razas se observó una diferencia significativa a favor de la raza Brahmán, la cual obtuvo una tasa media de 32,78 % ( $p < 0,05$ ), por sobre las razas Braford y Brangus, quienes alcanzaron una tasa de 25,82 % y 26,27 %, respectivamente. El comportamiento individual de los reproductores macho dentro de cada raza fue variable, habiendo diferencia entre las tasas mínimas y máximas de producción alcanzadas por los mismos. Si bien son muchos los factores que intervienen en la eficiencia de la técnica, es importante tener en cuenta la variación individual que presenta el semen de cada reproductor macho utilizado en la FIV, afectando marcadamente a la misma.

## INTRODUCCIÓN

La implementación de biotecnologías reproductivas como la aspiración folicular (OPU) y la fertilización *in vitro* (FIV) en los sistemas de reproducción permiten mejorar rápidamente la genética del ganado mejorando el rendimiento y la transmisión de genes (Watanabe et al., 2017). La FIV es una biotecnología que intenta acelerar en forma importante el progreso genético resultante de mezclar diferentes genotipos dentro de una misma especie (Peláez, 2011), aprovechando al máximo el material biológico de hembras y machos con el objetivo de tener una mayor descendencia por animal y disminuir los intervalos de producción teniendo como resultados producciones sostenibles y sustentables para el éxito de la industria ganadera (Puerta, 2008).

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) es utilizada para producir en un ambiente creado en el laboratorio, ello involucra el control de los mecanismos de maduración e interacción de los gametos femeninos y masculinos en un ambiente artificial con el fin de producir embriones (Filipiak y Larocca, 2010). El desarrollo de esta técnica involucra una serie de etapas que comprenden la recolección de los complejos cúmulos ovocitarios (COCs) de los folículos ováricos, la maduración *in vitro* (MIV), la fecundación *in vitro* (FIV) y el cultivo *in vitro* (CIV) de los posibles cigotos (Palma, 2008).

En la fertilización *in vitro*, el ovocito maduro se expone a espermatozoides previamente capacitados para que se produzca la fecundación proporcionando las condiciones óptimas que simulen lo que ocurre de forma natural (Lorenzo, 1994). La FIV tiene como propósito producir embriones, llevarlos a estadios avanzados para posteriormente ser transferidos a una hembra receptora (Quintana et al., 2012). Y entre las numerosas ventajas se destacan el poder elevar el rendimiento de producción de embriones en hembras de alto valor genético, se pueden obtener ovocitos de novillas a una edad de 6 meses, en vacas durante el primer trimestre de gestación y a partir de las dos a tres semanas de posparto (Galli et al., 2001). Permite obtener crías de hembras de buena calidad genética que por diversos problemas (infertilidad, alteraciones estructurales y funcionales adquiridas del tracto genital así como enfermedades infecciosas o edad) deban de ser sacrificadas y facilita la utilización de semen sexado (Herradón et al. 2007).

Dentro de los factores que pueden afectar la eficiencia de esta técnica se encuentra, estación del año, raza, nutrición animal, características fisiológicas individuales del animal como producción de ovocitos (Orellana y Peralta 2007), sin embargo la utilización del semen influye potencial mente sobre la eficiencia de la FIV ya que difieren en su capacidad para fertilizar ovocitos *in vitro*, dependiendo de diferentes factores de los espermatozoides como ser motilidad, integridad de la membrana y el acrosoma y la capacidad de penetrar los ovocitos (Ward *etal.*, 2003).

## **OBJETIVOS**

Objetivo general:

- Evaluar cómo influye el semen sobre la producción *in vitro* de embriones.

Objetivos específicos:

- Medir la respuesta fecundante según la raza.
- Comparar la tasa de clivaje y producción de embriones de cada toro utilizado.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Lugar**

El trabajo se realizó en el laboratorio de fertilización *in vitro* de la empresa “OVOX IN VITRO SRL”, ubicado en la ciudad de Corrientes capital, calle Lavalle 798, con el cual se cumplió la respectiva carta de acuerdo de trabajo con la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE, siendo su propietario M.V. Trevisán, José Gaspar.

Dicho laboratorio brinda el servicio de aspiración folicular (OPU), producción in vitro de embriones (PIVE), Direct Transfer (DT), producción de embriones a gran escala, producción de embriones sexados, transferencia embrionaria a establecimientos agropecuarios donde se producen animales genéticamente superiores en Argentina y exportación a países limítrofes.

## **Muestras**

Para desarrollar y cumplir con los objetivos del trabajo se buscó información en los registros del laboratorio, de aspiraciones y producción de embriones, que se realizaron desde su apertura en agosto de 2022 hasta julio de 2023. Los datos que se registraron fueron fechas de OPU, RP de donantes, raza de las donantes, nombre de los toros, raza de los toros, número de ovocitos (Grado 1, 2, 3), número de ovocitos degenerados, número de ovocitos viables, número de ovocitos totales, número de ovocitos madurados, número de ovocitos cultivados, número de ovocitos olivados y número de embriones producidos. Se obtuvieron datos de 705 OPU entre las razas Brahmán, Braford y Brangus.

El semen de los reproductores se obtuvo de centros genéticos, criopreservados. Los cuáles fueron asignados a cada donante por los asesores genéticos de cada establecimiento.

## **Obtención de los complejos cúmulus ovocitarios (COCs)**

El procedimiento fue llevado a cabo por un médico veterinario capacitado del laboratorio, se inmovilizó la hembra donante en la casilla de operar, se le aplicó anestesia local (lidocaína al 2%, dosis 5 cc) vía epidural y se realizó la higiene de la zona perianal (papel y alcohol 70%).

Para la OPU se utilizó un ecógrafo (Mindray DP30 Vet) con una sonda micro convexa (7,5 MHz), una guía de aspiración folicular (WTA) y un mandril (WTA) con aguja de 18G (JELCO); ésta última conectada a una línea de aspiración (TED) de 1,20 m que desembocaba en un tubo de 50 mi (CORNING) a través de la rolha de aluminio (WTA) que lo tapaba, la cual también se conectaba a la bomba de vacío (WTA) por una tubuladura de goma, generando una presión negativa dentro del tubo, fundamental para lograr la aspiración folicular.

La guía se introducía vía vaginal, una mano introducida por vía rectal se encargaba de la sujeción de los ovarios, obteniendo una imagen ecográfica de los folículos a aspirar ubicándolos en la línea de la salida de la aguja. Luego el mandril era empujado en dirección

craneal para introducir la aguja dentro del folículo y poder aspirar el líquido folicular, continuando por la línea de aspiración hacia el tubo de 50 ml.

### **Búsqueda y clasificación de ovocitos**

El tubo con el material obtenido fue transportado al laboratorio del establecimiento, que contaba con una mesada, buena iluminación e higiene en donde era inmediatamente filtrado (filtro WTA 60 µm), los restos de sangre fueron eliminados por continuos lavados con solución salina buferada PBS (SERENDIPIA- Flush Plus). El contenido ya filtrado se colocó en una placa de Petri cuadrículada de 110 mm en donde se localizaron y evaluaron morfológicamente los complejos cúmulos ovocitarios (COCs), con la ayuda de una lupa estereocópica binocular a 40X y micropipeta de 10 µl. Todo el proceso se realizó a una temperatura de 37°C, manteniendo el PBS en baño maría y las placas sobre platina térmica. Los ovocitos fueron clasificados en una planilla en base a la cantidad de capas de cúmulus presentes de acuerdo con el método International Embryo Transfer Society (IETS Manual, IL), Grado 1- tres o más capas de cumulus y citoplasma homogéneo, Grado 2- una a dos capas de cumulus presente, Grado 3- corona radiata únicamente o citoplasma granulado, picnótico o irregular, Grado 4- ovocito completamente desnudo.

### **Maduración de los ovocitos**

Los ovocitos a madurar fueron los Grados 1,2 y 3, lavándose dos o tres veces en gotas de 100 µl de medio de lavado, en las tapas de las placas de Petri utilizadas en la búsqueda (110 mm). Luego fueron cargados en los tubos de maduración (5 ml) con 400 µl de medio de maduración (MIV), 250 µl de aceite mineral, gaseados con gas mezcla (CO<sub>2</sub> 5% O<sub>2</sub> 5% y Balance Nitrógeno) y colocados en la transportadora de ovocitos (TED) a 38,5°C para ser enviados al laboratorio. En el laboratorio se retiraron los tapones de goma de los tubos y fueron colocados en una gradilla dentro de la incubadora a 38,8°C por 20-24 horas.

### **Fertilización *in vitro***

#### **Preparación de los ovocitos.**

Luego de 24 horas de maduración, y antes de la fertilización, se realizó el lavado de las estructuras, con medio FIV; el mismo se llevó a cabo en placas de Petri de 110 mm,

pasando sucesivamente de gota en gota. Este procedimiento se realizó con la finalidad de obtener estructuras libres de detritus que pudieran estar presentes, como así también para descartar aquellos ovocitos que estén muy deteriorados después del periodo de maduración. Posteriormente fueron colocados en placas de 35 mm que contenían gotas de 100 pl de medio FIV cubiertas con aceite mineral, previamente calibradas en incubadora para realizar la fertilización.

### **Preparación del semen**

Las pajuelas se descongelaron en un descongelador de pajuelas a 37°C durante 40 segundos. El método de capacitación espermática que se utilizó fue el gradiente de Percoll (45% y 90%).

En este procedimiento lo primero que se realizó para armar las columnas de Percoll, fue colocar en un eppendorf 400 pl de Percoll 45% (200 pl de Percoll 90% más 200 pl de medio de lavado) y luego, en la parte inferior se colocó 400 pl de Percoll 90% puro, evitando que se mezclen; previamente cada eppendorf se rotuló con el nombre del toro utilizado. La muestra de semen se colocó en la superficie y se lo llevó a centrifuga (mySPIN12 thermoscientific) a 3000 rpm durante 5 minutos, obteniéndose así el pellet de espermatozoides en el fondo del eppendorf.

### **FIV**

Para la fertilización se colocó 5-8 pl de pellet por gota. Luego las placas de FIV se colocaron en la incubadora durante 20-24 horas, a una temperatura de 38,8°C y una atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado (incubadora Thermo SCIENTIFIC).

### **Cultivo *in vitro*.**

Luego de 20-24 horas las placas se retiraron de la incubadora y se realizó un lavado de las estructuras por pasaje sucesivo en gotas de 50 pl, con medio de cultivo, para eliminar espermatozoides y medios. Finalmente se realizó la siembra en placas de cultivo de 35 mm, que contenían gotas de 100 pl de medio CIV cubiertas de aceite mineral; dichas placas se calibraron durante una hora y media previo al procedimiento. Por último, pasaron a incubadora en un ambiente controlado con 5% CO<sub>2</sub>, (estufa Thermo SCIENTIFIC). En el



día 3 (D3 o Clivaje) se realizó un recambio de medio CIV, eliminando 50 pl y agregando la misma cantidad para mantener los 100 pl de las gotas. Aquí también se evaluó el clivaje y se eliminaron las estructuras que no continuaron con la división. Se realizó el mismo trabajo el día 6 (D6) y en el día 7 (D7) se evaluaron y contabilizaron los embriones aptos para ser transferidos en fresco o criopreservados.

### **Análisis estadístico.**

Los datos obtenidos fueron cargados en planillas de Excel. Se realizaron medidas de resumen. El análisis comparativo de las variables evaluadas, se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA). Este modelo se analizó con el test de Tukey para poder comparar las medias de los tratamientos de esta investigación. Para el análisis de datos se utilizó el software InfoStat-Statistical (Di Renzo y col., 2020).

## **RESULTADOS**

En total fueron analizadas 705 muestras (OPU) pertenecientes a las razas Braford (205), Brahmán (135) y Brangus (365). Los valores de calidad de ovocitos están expresados en totales observados, y los de producción de embriones, en las diferentes etapas del proceso de producción, en porcentaje, obteniendo como resultados un % D3 (clivaje) de 69,71% ( $\pm 23,65$ ) y una tasa de producción de embriones del 27,39 % ( $\pm 20,19$ ). Los valores de calidad de ovocitos obtenidos en las OPU y porcentajes de embriones se expresan la Tabla 1.

**Tabla 1.** Medidas de resumen con las diferentes variables estudiadas.

<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>
G1	684	6,95	4,53
G2	684	15,13	10,82
G3	684	7,84	5,28
Degenerados	705	6,36	3,80
Totales	705	36,18	20,82
% Viables	705	79,58	12,77
% MIV	705	109,41	58,49
% CIV	705	79,75	14,80
% D3	705	69,71	23,65
% Embriones	705	27,39	20,19

Si nos referimos a la producción de embriones discriminando las diferentes razas, se observa una diferencia significativa a favor de la raza Brahmán, la cual obtuvo una tasa media de producción de  $32,78 \pm 1,73$  ( $p < 0,05$ ), sobre las razas Braford y Brangus, quienes alcanzaron una tasa de  $25,82 \pm 1,40$  y  $26,27 \pm 1,05$ , respectivamente (Tabla 2).

**Tabla 2.** Tasa de producción de embriones según las diferentes razas (%).

<b>Raza del Toro</b>	<b>Medias</b>	<b>E.E.</b>
Braford	25,82 a	1,40
Brangus	26,27 a	1,05
Brahmán	32,78 b	1,73

*Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).*

Si evaluamos individualmente a cada reproductor utilizado por raza, podemos decir que los mismos presentan un comportamiento variable, ya que dentro de cada raza hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ), entre la tasa más baja de producción de embriones y la tasa más alta alcanzada por los mismos. En la raza Braford se utilizaron 15 toros, donde las medias de producción variaron 15,01 a 41,18 (%), en la raza Brahmán se utilizaron 12 toros, donde las medias fluctuaron entre 13,59 a 41,92 (%), y por último en la raza Brangus se utilizaron 19 toros, donde las medias fueron desde 17,32 a 44,46 (%).

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la fertilización *in vitro* no pueden ser atribuidos en su totalidad al semen utilizado, ya que es una técnica multifactorial, donde se debe tener en cuenta factores ambientales, nutrid onales, sanitarios, técnicos, humanos y animal, al momento de la recolección seminal, congelamiento, diluyentes, almacenamiento y transporte de semen, así como elaboración de medios, aspiración de la donante, búsqueda de ovocitos, calidad de ovocitos, capacitación seminal, fertilización, cambios y alimentaciones; por lo tanto los resultados no definen que toros son excelentes, buenos o malos ya que los clivajes que se promediaron por toros son de diferentes trabajos, con diferentes vacas y en diferentes periodos. El mejor indicador de eficiencia en producción de embriones *in vitro* es la cantidad y calidad de blastocistos producidos al día 7 post

fecundación. Esto es muy importante, debido a que existen evidencias que sugieren que el periodo de maduración, fecundación y cultivo de embriones puede afectar su potencial de desarrollo temprano embrionario y junto a la calidad del ovocito es la llave determinante para obtener los blastocistos de calidad y cantidad (Lonergan et al., 2006).

(Palma, 2001), asegura que los resultados a través de la última década indican que 20 a 40% de los ovocitos seleccionados para maduración *in vitro* alcanzan el estadio de blastocito, coincidiendo con este trabajo en donde se obtuvo una media de 27,39. (Cabrera y Washington 2008), muestran y comparan los porcentajes de fertilización obtenidos con semen de 4 toros (no da a conocer la raza). Los cuales fueron mayores a los obtenidos en el presente estudio, con rangos de 56,7% a 72,8%, donde el análisis estadístico de los resultados muestra que no hay diferencia significativa entre los 4 toros a pesar que en el momento de evaluar su motilidad post descongelación y post capacitación con Percoll los toros con mayor porcentaje de fertilización 66,6% y 73,3% tuvieron el porcentaje más bajo de motilidad 53,3%.

Similares resultados son encontrados por (Fernández et al. 1999), donde la tasa de fecundación para la producción de embriones *in vitro* fue de 74% con el uso de semen de toros *Bos indicus* y *Bos taurus*. Esto es corroborado también por (Medina et al. 2002), quienes encontraron una fertilidad *in vitro* de 77,3% y 78,5% para diferentes toros.

Conjuntamente (Puglisi et al., 2006), estudiando el comportamiento en la FIV de semen provenientes de dos toros diferentes, reportan una menor tasa de fertilidad en uno de ellos ya que cada animal es capaz de expresar sus características fenotípicas y reproductivas individualmente, coincidiendo en parte con la variación individual de cada reproductor obtenida en este ensayo. Por otra parte, (Wilson et al., 2006) estudiaron el semen de diferentes toros en FIV no obteniendo diferencias en la tasa de fertilidad, pero si en la producción de embriones.

(Bastidas et al., 1999), estudiaron el potencial fertilizante en *Bos taurus*, *Bos indicus* y búfalos. Encontraron diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre la tasa de fertilización de los ovocitos de vaca (68%) comparada con los ovocitos de búfala (47 %), no encontrándose diferencias significativas entre la capacidad fertilizante de los diferentes tipos de semen

( $P>0.05$ ); demostrando la factibilidad de la implementación de la técnica de FIV heteróloga, donde existe una fuente económica de ovocitos bovinos a nivel de camal, permitiendo incorporar un método de predicción del potencial fertilizante de semen de reproductores de diferentes especies a nivel de laboratorio.

## **CONCLUSIONES**

Este trabajo demuestra la factibilidad de poder llevar adelante esta biotecnología reproductiva en beneficio de la multiplicación genética de individuos superiores, ya que se obtuvo tasa de producción de embriones dentro de las medias establecidas.

Si bien son muchos los factores que intervienen en la eficiencia de la técnica, es importante tener en cuenta la variación individual que presenta el semen de cada reproductor macho utilizado en la FIV, afectando marcadamente a la misma. También mencionar, que la raza que obtuvo una mejor tasa de producción de embriones fue la Brahmán, pudiendo esto deberse a una característica intrínseca de la misma o también a la mayor adaptabilidad al ambiente subtropical donde nos encontramos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Bastidas, P., Fernandez. A. y Troconiz. (1999). Fertilización in Vitro Heteróloga en Búfalos. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Aragua, Venezuela
- Cabrera, P., Washington, K., (2008). Evaluación de la fertilidad In vitro del semen de toros jóvenes nacionales en ovocitos provenientes de ovocitos de animales beneficiados. Anales Científicos UNALM, 70, 75-80
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; González, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

- Fernandez, A.; Bastidas, P.; Troconiz, J. (1999). Fertilización in vitro de ovocitos recolectados de vacas cebú postmortem. *Rev. Fac. Cs. Vets*, (2) 89-100
- Filipiak, Y.; Larocca, C.; 2010. Fertilización in vitro en bovinos. Manual teórico-práctico. Facultad de Veterinaria - Universidad de la República. Departamento de Reproducción Animal. Área de Biotecnología. Montevideo, Uruguay., 1,4, 8-9
- Galli, C., G. Crotti, C. Notari, P. Turini, R. Duchi y G. Lazzari. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55(6): 1341-1357
- Herradón, P.G., L.A. Quíntela, J.J. Becerra, S. Ruibal y M. Fernández. 2007. Fecundación in vitro: alternativa para la mejora genética en bovinos. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 15(1): 34-41.
- Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 2006; 65:137-152
- Lorenzo, P.L. 1994. Fecundación y desarrollo embrionario temprano. En: Reproducción de los animales domésticos. Cap. 6. Madrid: Ed. Aedos. p 182-187.
- Medina, M.; Cattaneo, L.; Caballero, J.; Cerrate, H.; Panarace, M.; Ferré, L.; Dalla, M. (2002). Semen sexado y congelado en Argentina. Resultados de su utilización en programas de inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización *in vitro*. *Taurus*, (13) 4-8
- Orellana, J. Peralta, E. 2007. Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and Sexing Technologies. Recuperado febrero, 18,2019 De <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/1036/758/1/T2520.pdf>
- Palma. 2001. Producción in vitro de Embriones Bovinos. Factores que Afectan los Resultados (Semen). Biotecnología de la Reproducción Gustavo. A. Palma. Primera Edición. 2001. Balcarce. Argentina. Pago 257: 259.
- Palma, G.A.; 2008. Producción in vitro de embriones. En: Biotecnología de la reproducción, 2º ed., Pugliese y Siena, Mar del Plata, p: 313-378
- Peláez, V. 2011. Producción In vitro de embriones bovinos. Recuperado el 10 de enero de 2019, <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3053/1/mv170>

- Puerta, L. 2008. Aplicación de la biotecnología de la aspiración folicular (OPU) y fecundación in vitro (fiv) como herramienta para un mejor aprovechamiento de las hembras cebuinas dentro del plan de modernización del hato ganadero colombiano. Recuperado el 04 de enero de 2019, <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/6669/00797729.p>
- Puglisi, R.; Vanni, R.; Galli, A.; Balduzzi, D.; Parati, K.; Bognioni, G.; Crotti, G.; Duchi, R.; Galli, C.; Lazzari, G.; Aleandri, R. (2006). *in vitro* fertilisation with frozenthawed bovine sperm sexed by flow cytometry and validated for accuracy by realtime PCR. *Reproduction*, (3) 519-26
- Quintana, M.D., P.E.C. Campos, P. Herrera, C. Gallego y E. Padrón. 2012. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros para fertilización in vitro FIV obtenidos de hembras *Bubalus bubalis* enviadas a matadero. *Revista de Salud Animal* 34(1): 53-56
- Ward, F. Rizos, D. Boland, M.P. Lonergan, P. 2003. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. *Theriogenology* 59: 1575-1584.
- Watanabe, E., Souza, A., Mingoti, R., Machado, R., Santana, E., Dayan, A., Watanabe, O., Meirelles, F., Nogueira, M., Ferraz, J., Baruselli, P. 2017. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. *Anim. Reprod*, 14,635-644
- Wilson, R. D.; Fricke, P. M.; Leibfried-Rutledge, M. L.; Rutledge, J. J.; Penfield, C. M.; Weigel, K.A. (2006). *in vitro* production of bovine embryos using sex-sorted sperm. *Theriogenology*, (6) 1007-15