

Viabilidad y tasa de preñez de embriones producidos *in vitro* a partir de semen sexado comparado con semen convencional en *Bos taurus* y *Bos indicus*

Viability and pregnancy rate of embryos produced *in vitro* from sexed semen compared to conventional semen in *Bos taurus* and *Bos indicus*

Lilian Bonilla León^{1,4}, Andrés Mejía Gallego², Ramón Gómez Domínguez³, Martha Torres Londoño³, Fabian Uribe García¹

RESUMEN

El estudio se realizó con la producción de embriones *in vitro* del laboratorio In Vitro Colombia® de 2015. Se analizó la tasa de división embrionaria, la producción de embriones *in vitro* (PIV) y la tasa de preñez teniendo en cuenta el tipo de semen utilizado (sexado y convencional) para la fertilización y la especie bovina (*Bos taurus*, *Bos indicus*). Se analizaron datos de 840 sesiones de aspiración folicular, resultando 127 503 oocitos puestos en cultivo *in vitro* provenientes de 5257 hembras. La tasa de división embrionaria para el semen sexado fue de 69.6% y para el semen convencional de 74.5% ($p < 0.001$). Se obtuvo 20.8% de PIV para el semen sexado y de 26.5% para el convencional ($p < 0.001$). El semen sexado de *B. taurus* se comportó mejor en términos de división embrionaria que el de *B. indicus* (71.1 vs. 64.4%) ($p < 0.001$), mientras que el semen convencional de *B. indicus* se comportó mejor que el de *B. taurus* (76.0 vs. 70.3%) ($p < 0.001$). En la PIV, el semen sexado de *B. indicus* se comportó mejor que el semen de *B. taurus* (21.5 y 20.7%, respectivamente; $p = 0.008$), mientras que con semen convencional la PIV de *B. indicus* fue de 28.2% frente a 22.2% de *B. taurus* ($p < 0.001$). No hubo diferencias significativas para las tasas de preñez. Se concluye que el uso de semen sexado para la producción de embriones bovinos *in vitro* es viable.

Palabras clave: aspiración folicular; OPU; transferencia de embriones; semen sexado; producción de embriones *in vitro*

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Tolima, Ibagué, Tolima, Colombia

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colombia, sede Salado, Ibagué, Tolima, Colombia

³ Laboratorio de Fecundación In Vitro, InVitro, Colombia

⁴ E-mail: lory0101@yahoo.com

Recibido: 9 de febrero de 2018

Aceptado para publicación: 6 de agosto de 2018

ABSTRACT

The study was carried out with the *in vitro* embryo production of the In Vitro Colombia® laboratory of 2015. The embryo cleavage rate, the *in vitro* embryo production (IVP) and the pregnancy rate were analysed based on the type of semen used (sexed and conventional) for fertilization and on the bovine species (*Bos taurus*, *Bos indicus*). Data from 840 sessions of follicular aspiration were analysed, resulting in 127 503 oocytes placed in *in vitro* culture from 5257 females. The embryonic cleavage rate for sexed semen was 69.6% and for conventional semen 74.5% ($p < 0.001$). It was obtained 20.8% of IVP for sexed semen and 26.5% for conventional semen ($p < 0.001$). The sexed semen of *B. taurus* performed better in terms of embryonic cleavage than that of *B. indicus* (71.1 and 64.4%, respectively ($p < 0.001$), whereas the conventional semen of *B. indicus* performed better than *B. taurus* (76.0 and 70.3%, respectively, $p < 0.001$). In the IVP the sexed semen of *B. indicus* performed better than the semen of *B. taurus* (21.5 and 20.7%, respectively, $p = 0.008$), whereas with conventional semen the IVP of *B. indicus* was 28.2% compared to 22.2% of *B. taurus* ($p < 0.001$). There were no significant differences for pregnancy rates. It is concluded that the use of sexed semen to produce *in vitro* bovine embryos is viable.

Key words: ovum pick-up; OPU; embryo transfer; sexed semen; *in vitro* embryo production

INTRODUCCIÓN

El ciclo reproductivo natural en el bovino conduce al nacimiento de una cría por año en el mejor de los casos. Para mejorar la eficiencia reproductiva de animales de alto mérito genético se utilizan técnicas de reproducción asistida (Plourde *et al.*, 2012). A mediados de la década del 80, la única tecnología de embriones que se aplicaba en la práctica para la multiplicación de la hembra bovina era la superovulación y transferencia de embriones (*Multiple Ovulation and Embryo Transfer* - MOET). Pronto se hizo evidente que esta técnica tenía límites y que podían desarrollarse otras técnicas para la producción de embriones requeridos por la industria ganadera. Con el tiempo se consideró la idea de aprovechar la cantidad de oocitos presentes en los ovarios (Galli y Lazzari, 2008). De esta forma, la fecundación *in vitro* (FIV) surgió como una alternativa a la superovulación y se ha convertido en la técnica de elección para la producción de embriones bovinos, especialmente en razas de *Bos indicus* (Viana *et al.*, 2012).

Las tecnologías de reproducción asistida en animales de granja han sido utilizadas con éxito en todo el mundo, aumentan la importancia de las hembras en programas de mejoramiento genético y desempeñan un papel importante en la mejora de la precisión e intensidad de la selección de rasgos cuantitativos en vacas lecheras (Guerreiro *et al.*, 2014). En condiciones normales de reproducción, la probabilidad de obtener hembra o macho es de 50%, pero en las fincas ganaderas de producción de leche se busca tener mayores nacimientos de hembras, pues los machos tienen un retorno monetario mínimo para el productor (Barceló-Fimbres *et al.*, 2011; Jo *et al.*, 2014).

Es posible y económicamente viable la combinación del uso de semen sexado y la fecundación *in vitro*, ya que predeterminando el sexo del embrión se logrará una mayor eficiencia, especialmente en ganadería de leche (Barceló-Fimbres *et al.*, 2011) al obtenerse más frecuencia de hembras (Rasmussen *et al.*, 2013). Hinde *et al.* (2014) encontró, además, que el promedio de producción de lactancia era más alto en la se-

gunda lactancia cuando las vacas gestaban una cría hembra.

El objetivo de este trabajo fue presentar datos de producción de embriones *in vitro* a gran escala, basado en el trabajo de campo y el laboratorio de In Vitro Colombia®, con el fin de analizar la eficiencia del semen sexado en la producción de embriones *in vitro* y por medio de los promedios de producción comparar los resultados entre *Bos indicus* y *Bos taurus* sobre división embrionaria, producción de embriones y tasa de preñez.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos fueron tomados por el laboratorio In Vitro Colombia® durante 2015, en varias zonas del país, donde se realizaron 840 sesiones de aspiración folicular, de las cuales se obtuvieron 127 503 oocitos puestos en cultivo de 5257 hembras bovinas de diferente condición racial y categoría reproductiva. Las donadoras fueron seleccionadas según el interés del productor en cuanto a características productivas fenotípicas y genéticas intrínsecas de cada explotación. La edad de los animales fue variable.

Las variables objetivo de comparación fueron las tasas de división embrionaria, la producción de embriones y la tasa de preñez. La información se filtró de acuerdo a las variables a comparar (especie [*Bos indicus*, *Bos taurus*], tipo de semen [convencional, sexado]) y para el caso de la preñez se utilizaron los datos de embriones transferidos que tuvieron resultado de diagnóstico de gestación.

Donadoras

Las donantes de oocitos fueron animales libres de enfermedades reproductivas transmisibles, en condición corporal aceptable (mínimo 3, en escala de 1-5). Los animales seleccionados no estaban gestantes o tenían máximo 120 días de gestación al mo-

mento de la aspiración folicular. Las donantes en este estudio se sometieron a la aspiración folicular sin sincronización previa de la onda folicular.

Semen

El semen que se utilizó en los procesos de fecundación *in vitro* provino de casas comerciales nacionales e internacionales y poseen entre 2 y 10 millones de espermatozoides en el caso de semen sexado y entre 10 y 40 millones de espermatozoides en el caso de semen convencional. La calidad y concentración del semen fue evaluada en el laboratorio por el técnico encargado de la fecundación *in vitro* (datos no presentados en este trabajo).

Se trabajó con hembras bovinas *Bos indicus* (Brahman, Guzerat, Gyr, Nelore) y *Bos taurus* (Simmental, Holstein, Angus, Blonde Dáquitania, Piemontese, Ayrshire, Charolais, Braunvieh, Jersey, Limousin, Normando, Pardo Suizo, Rojo Alemán, Wagyu).

Aspiración Folicular (OPU)

La aspiración folicular se llevó a cabo según la técnica descrita por Seneda *et al.* (2001). Los complejos de oocitos-cúmulos fueron clasificados de la siguiente forma: Grado 1) más de tres capas de material compacto de células del cúmulo; Grado 2) al menos una capa de células del cúmulo; Grado 3) desnudo; Grado 4) atrésico, con células cúmulos oscuras y signos de degeneración citoplasmática (Seneda *et al.*, 2001). Los oocitos atrésicos se descartan y los demás (Grados 1, 2 y 3) se utilizan en el proceso de producción de embriones *in vitro* (PIV).

Fertilización y Producción de Embriones *in vitro*

Los oocitos recuperados fueron sometidos al tratamiento propuesto por Pontes *et al.* (2011). El material aspirado se filtró inmediatamente a través de un filtro EmCon con solución salina tamponada con fosfato

(PBS-Nutricell, Brasil) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5%. Antes de la maduración *in vitro* (MIV), los complejos del cúmulo del oocito (COC) se lavaron tres veces con TCM-199 HEPES (Gibco Life Technologies, EEUU) suplementado con SFB al 10% y sulfato de gentamicina 50 g y una vez en bicarbonato TCM-199 (Gibco Life Technologies) (Pontes *et al.*, 2011) suplementado con SFB al 10%, 5 g de hormona luteinizante (LH, Ayerst, EEUU), 0.5 g hormona foliculo estimulante (FSH - Folltropin, Vetrepharm, Canadá), 1 g de estradiol (17 β estradiol, Sigma E-8875), 2.2 g de piruvato (Sigma P-4562) y 50 g de gentamicina/ml de medio.

Los COC de cada categoría se cultivaron por separado para 24 h en 100 L gotas de medio de maduración bajo Petróleo mineral (D'Altomare, Brasil) en 39°C con CO₂ al 5% (Gordon, 1994; Smith *et al.*, 1996). Para la FIV, dos pajillas se descongelaron durante 20 segundos en baño de maría a 35 °C. El semen fue lavado y centrifugado a través de un gradiente 90 - 45% de Percoll a 200 g durante 30 min. El espermatozoides fue capacitado usando heparina (30 g/ml) y la motilidad fue estimulada por la adición de 40 μ l/ml de factores de motilidad espermática y pemicilamida (PHE) (Bavister, 1989). La concentración de espermatozoides se ajustó a 25x10⁶ espermatozoides vivos/ml, y cada gota de fertilización recibió 4 μ l de espermatozoides (concentración final 100x10³ células por gota) (Seneda *et al.*, 2001).

Después de la maduración, los COC se lavaron tres veces en el medio de pre-fertilización de TCM-199 suplementado con HEPES 25 mM y albúmina sérica bovina (BSA) al 0.3% (Sigma A-9647) y una vez en medio de fertilización TALP suplementado con 10 g/ml de heparina y 160 μ l de solución PHE (Parrish *et al.*, 1986, 1988). Después de la FIV, los oocitos y los COC se transfirieron a gotas de 100 μ l de medio de cultivo para embriones, un fluido sintético modificado del oviducto, SOFaa BSA, conteniendo 8 mg/ml de BSA (Sigma, EEUU) libre de ácido graso y glutamina 1 mM. Permanecieron

en este medio entre 5 y 8 días. Este paso se realizó bajo condiciones de misma temperatura y ambiente gaseoso. La osmolaridad se mantuvo en 270 -280 mOsmol y el pH fue de 7.4.

El semen para la FIV se separó en Percoll 90 al 45% y se centrifugó (200 g) durante 30 min, antes de ajustarse para obtener una concentración final de 100x10³ espermatozoides viables por gota. La FIV se llevó a cabo durante 18 h a 39 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% en aire. Después de la fecundación, las estructuras se lavaron y se transfirieron a 100 μ l de medio fluidizado de oviducto sintético modificado y se cubrieron con aceite mineral. El medio de cultivo se renovó para cada micropozo después de 3 y 5 días (alimentación), y después de 6 días fue llevado a la granja para transferir los embriones a las vacas receptoras (Perez *et al.*, 2016).

Los embriones se clasificaron de acuerdo con los criterios IETS (Wright, 1998). Solo se consideraron embriones de grado I o II para transferir (embriones de mórula y blastocistos de 6 y 7.5 días de desarrollo). La calidad embrionaria, el número de células embrionarias de la masa celular interna y trofoectodermo, incidencia de apoptosis, capacidad de eclosión, anomalías cromosómicas y expresión de genes específicos, han sido aceptados extensamente como determinantes de la calidad embrionaria (Sugimura *et al.*, 2017).

Sincronización de Receptoras

La evaluación de la receptora para establecer su estado reproductivo y sanidad se hizo con ayuda de un equipo de ultrasonido (Mindray DP 50 y transductor lineal de 7.5 MHz). Los animales seleccionados se sometieron a un protocolo de sincronización de estro hormonal, usando un dispositivo de progesterona intravaginal de liberación lenta de 0.5 g (Calier-Syntex) por 7 u 8 días, benzoato de estradiol de 1 mg/ml (Calier-Syntex), cloprostenol 0.075 mg/ml y gonadotropina coriónica equina Novormon (Calier-Syntex) (ver Figura 1).

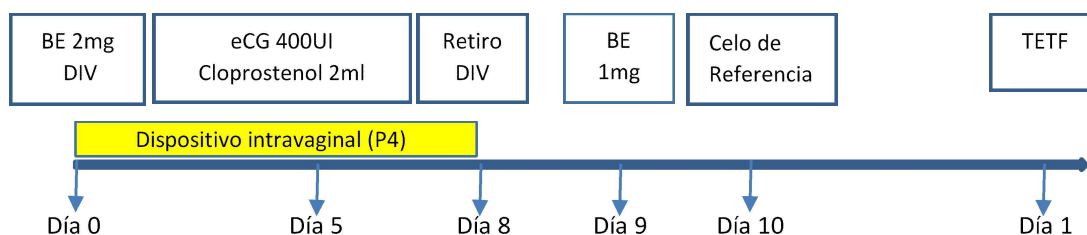


Figura 1. Protocolo de sincronización para transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF)

Transferencia de Embriones

La transferencia de embriones se realizó a los 17 días de haber iniciado el protocolo de sincronización (Nasser, 2004), previa detección de un cuerpo lúteo mayor a 16 mm mediante ultrasonografía transrectal (Mindray DP 50 y transductor lineal de 7.5 MHz).

Para la transferencia, se aplicó anestesia epidural (4 ml de lidocaína) a la receptora, se limpió la zona perivulvar y el embrión fue colocado en la parte más distal del cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo resultante del protocolo. Los embriones de mórula y blastocistos de 6 a 7.5 d posfecundación fueron transferidos individualmente a cada receptora (Pontes *et al.*, 2011).

Diagnóstico de Gestación

El diagnóstico de gestación se hizo a los 35-60 días de la transferencia de embriones, mediante ecografía sobre el útero de la receptora. Se identificó la presencia de vesícula gestacional y se corroboró la fetocardia positiva utilizando un ultrasonido modo B Mindray DP 10 con transductor de 7.5 mHz.

Evaluación Estadística

Se evaluó la tasa de clivaje o división embrionaria, la producción de embriones y la tasa de preñez según el tipo de semen utilizado y entre *B. taurus* vs. *B. indicus*.

Los datos obtenidos de los procedimientos de aspiración folicular (oocitos que entran a la maduración *in vitro*), de la división

embrionaria y la tasa de preñez se analizaron utilizando el programa estadístico Minitab 16[®]. En el caso de las variables de tipo categórico se realizó una comparación de proporciones: número de oocitos puestos a cultivo con la división embrionaria o clivaje y los embriones obtenidos. En el caso de la tasa de preñez se comparó la cantidad de embriones transferidos con los datos de preñez. El programa Minitab 16[®] aplica la prueba de Fisher para establecer si hay diferencia entre las proporciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se entiende como principio que el desarrollo embrionario depende completamente de la integridad y del criterio de selección del oocito para la fertilización (Morotti *et al.*, 2014). En general, la producción de embriones y la tasa de división embrionaria en el semen convencional se comportó mejor que el semen sexado, teniendo valores significativamente más altos.

Inaba *et al.* (2016) señalan que no obtuvieron diferencia significativa comparando los tipos de semen en la división de embriones ni en la producción de embriones *in vitro*. Por otro lado, Barceló-Fimbres *et al.* (2011) plantean que las diferencias obtenidas por el tipo de semen en la división embrionaria pudieron deberse a la cinética de penetración, que puede estar afectada por el procedimiento de sexaje del semen. Así mismo, Lonergan y Fair (2008) creen que un factor fundamental para este parámetro tiene que ver con la ca-

Cuadro 1. Comparación de los parámetros de producción de embriones (%) obtenidos del análisis de la producción *in vitro*, comparando semen de *Bos Taurus* y *Bos indicus*, y entre el tipo de semen utilizado

	<i>Bos taurus</i>			<i>Bos indicus</i>			Total		
	Semen sexado	Semen convencional	P	Semen sexado	Semen convencional	P	Semen sexado	Semen convencional	P
División embrionaria	71.1 (70.8-71.4)	70.3 (69.0-71.6)	0.2	64.4 (63.8-65.1)	76 (75.5-76.6)	<0.001	69.6 (69.4-70.0)	74.5 (74.1-75)	<0.001
Producción de embriones	20.7 (20.5-21.0)	22.2 (21.0-23.2)	0.01	21.5 (21-22.1)	28.2 (27.7-28.8)	<0.001	20.8 (20.6-21.2)	26.5 (26.0-27.0)	<0.001
Preñeces obtenidas	44.4 (42.0-46.1)	49.4 (42.6-56.4)	0.1	45.1 (42.4-47.9)	46 (43.7-48.4)	0.62	44.6 (43.2-46)	46.0 (43.8-48.2)	0.3

Intervalo de confianza al 95% entre paréntesis

lidad del oocito, aspecto que no se evaluó en este estudio. Mejía (2010) reportó que la movilidad de los espermatozoides en el semen de toros *Bos indicus* se afecta menos que el semen de toros *Bos taurus* por el proceso de sexaje.

Si bien se describe que la técnica de sexaje del semen afecta la competencia espermática y la habilidad de desarrollo embrionario al alterar componentes de la membrana celular (Inaba *et al.*, 2016), algunos trabajos reportan que no existe una diferencia en las tasas de desarrollo de blastocisto usando semen sexado (Lu y Seidel, 2004; Zhang *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2010).

Blondin *et al.* (2009) obtuvieron mayor división embrionaria, pero menores tasas de blastocisto usando semen sexado. Las diferencias pueden atribuirse a cambios en los protocolos, al aumentar la concentración de espermatozoides (Barceló-Fimbres *et al.*,

2011), y al aplicar estrategias para reducir el daño del sexado (Rath *et al.*, 2013). Por otro lado, Contreras *et al.* (2015) reportaron tasas de división embrionaria similares entre semen convencional y sexado; sin embargo, el uso de semen sexado disminuyó la formación de blastocisto (15.6% vs. 18.9%, respectivamente).

Tanno (2009) y Mejía (2010) afirman que el semen sexado de *Bos indicus* tiene mayor resistencia para soportar los daños de la integridad de la membrana plasmática, pero se desconoce el mecanismo que lo hace más resistente. No obstante, algunos trabajos reportan resultados similares al obtenido en este estudio sobre la tasa de división embrionaria, donde hubo una disminución en el desarrollo de la tasa de blastocisto al usar semen sexado (Merton *et al.*, 1997; Bermejo-Alvarez *et al.*, 2008; Palma *et al.*, 2008; Stinshoff *et al.*, 2012).

Carvalho *et al.* (2010) concluyeron que el procedimiento de sexado por citometría de flujo afectó a algunas características estructurales de los espermatozoides bovinos, pero no redujo su capacidad para producir embriones *in vitro*. Además, los embriones masculinos y femeninos producidos por espermatozoides clasificados tuvieron un desarrollo similar *in vitro*.

En el presente trabajo no hubo diferencia significativa en ninguna de las comparaciones sobre la tasa de preñez, obteniéndose una tasa de preñez general de 46%, siendo de 44.4% con semen sexado. Pellegrino *et al.* (2016) obtuvo tasas de preñez de 35.4% con semen sexado, en tanto que Pontes *et al.* (2011) obtuvieron 36% de preñez con semen sexado. Asimismo, Pontes *et al.* (2010) reportan tasas de preñes de 40% para vacas Gyr, 36% para vacas Holstein, 37% para 1/4 Holstein 3/4 Gyr, y 37% para 1/2 Holstein-Gyr utilizando semen sexado. Xu *et al.* (2009) por otro lado, reportaron tasas de preñez de 40% y sin diferencia significativa entre el uso de semen sexado o semen convencional para la producción de embriones *in vitro*.

CONCLUSIONES

- La producción de embriones y la tasa de división embrionaria fue mejor con el semen convencional en comparación con el semen sexado.
- No hubo diferencia significativa en la utilización de semen convencional o semen sexado en la tasa de preñez de animales *Bos taurus* y *Bos indicus*.

LITERATURA CITADA

1. **Bavister BD. 1989.** A consistently successful procedure for *in vitro* fertilization of golden hamster eggs. *Gamete Res* 23: 139-158. doi: 10.1002/mrd.1120230202
2. **Barceló-Fimbres M, Campos-Chillón LF, Seidel GE. 2011.** *In vitro* fertilization using non-sexed and sexed bovine sperm: sperm concentration, sorter pressure, and bull effects. *Reprod Domest Anim* 46: 495-502. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01696.x
3. **Bermejo-Álvarez P, Rizos D, Rath D, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A. 2008.** Can bovine *in vitro*-matured oocytes selectively process X- or Y-sorted sperm differentially? *Biol Reprod* 79: 594-597. doi: 10.1095/biolreprod.108.070169
4. **Blondin P, Beaulieu M, Fournier V, Morin N, Crawford L, Madan P, King WA. 2009.** Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology* 71: 30-38. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.017
5. **Carvalho JO, Sartori R, Machado GM, Mourão GB, Dode MA. 2010.** Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use *in vitro* embryo production. *Theriogenology* 74: 1521-1530. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.030
6. **Contreras WO, Alvis-Miranda HR, Gamarra AF, Rendon B, Borda DA, Albicker U, et al. 2015.** Effects of sexed semen and interactive effects on commercial *in vitro* embryo production when oocytes are collected from cows of *Bos indicus*, and *Bos taurus* breeding and crossbred cows of these subspecies. *Anim Reprod Sci* 156: 58-63. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.02.009
7. **Galli C, Lazzari G. 2008.** The manipulation of gametes and embryos in farm animals. *Reprod Domest Anim* 43 (Suppl 2): 1-7. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01136.x
8. **Gordon I. 1994.** Laboratory production of cattle embryos. Cambridge: CAB International. 640 p.
9. **Guerreiro BM, Batista EO, Vieira LM, Sá Filho MF, Rodrigues CA, Castro A, et al. 2014.** Plasma anti-Mullerian hormone: an endocrine marker for *in vitro* embryo production from *Bos taurus*

- and *Bos indicus* donors. *Domest Anim Endocrin* 49: 96-104. doi: 10.1016/j.domaniend.2014.07.002
10. **Hinde K, Carpenter AJ, Clay JS, Bradford BJ. 2014.** Holsteins favor heifers, not bulls: biased milk production programmed during pregnancy as a function of fetal sex. *Plos One* 9: e86169. doi: 10.1371/journal.pone.0086169
 11. **Inaba Y, Abe R, Geshi M, Matoba S, Nagai T, Somfai T. 2016.** Sex-sorting of spermatozoa affects developmental competence of *in vitro* fertilized oocytes in a bull-dependent manner. *J Reprod Develop* 62: 451-456. doi: 10.1262/Jrd.2016-032
 12. **Jo HT, Bang J, Kim SS, Choi BH, Jin JI, Kim HL, Jung IS, et al. 2014.** Production of female bovine embryos with sex-sorted sperm using intracytoplasmic sperm injection: Efficiency and *in vitro* developmental competence. *Theriogenology* 81: 675-682. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.11.010
 13. **Lonergan P, Fair T. 2008.** *In vitro*-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* 69: 17-22. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.09.007
 14. **Lu KH, Seidel GE. 2004.** Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology* 62: 819-830. doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.12.029
 15. **Mejía A. 2010.** Avaliação das características da motilidade (CASA), morfologia e funcionalidade da membrana plasmática (HOST) de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo. Tesis de Maestría. Dao Paulo, Brasil: Universidade de São Paulo.
 16. **Merton JS, Haring RM, Stap J, Hoebe RA, Aten JA. 1997.** Effect of flow cytometrically sorted frozen/thawed semen on success rate of *in vitro* bovine embryo production. *Theriogenology* 47: 295.
 17. **Morotti F, Sanches BV, Pontes JHF, Basso AC, Siqueira ER, Lisboa LA, Seneda MM. 2014.** Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology* 81: 696-701. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.12.002
 18. **Nasser LF, Reis EL, Oliveira MA, Bó GA, Baruselli PS. 2004.** Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo transfer in *Bos indicus* x *Bos taurus* recipients. *Theriogenology* 62: 1577-1584. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.03.013
 19. **Palma GA, Olivier NS, Neumüller C, Sinowatz F. 2008.** Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of *in vitro* fertilization and ultrastructure of *in vitro* produced bovine blastocysts. *Anat Histol Embryol* 37: 67-73. doi: 10.1111/j.1439-0264.2007.00795.x
 20. **Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfriedge-Ruthedge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. 1986.** Bovine *in vitro* fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology* 25: 591-600.
 21. **Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. 1988.** Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38: 1171-1180.
 22. **Pellegrino CA, Morotti F, Untura RM, Pontes JH, Pellegrino MF, Campolina JP, et al. 2016.** Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of *in vitro*-produced embryos in cattle. *Theriogenology* 86: 888-893. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.03.010
 23. **Perez BC, Peixoto MG, Bruneli FT, Ramos PV, Balieiro JC. 2016.** Genetic analysis of oocyte and embryo production traits in Guzerá breed donors and their associations with age at first calving. *Genet Mol Res* 15(2). doi: 10.4238/gmr.15027583
 24. **Plourde D, Vigneault C, Laflamme I, Blondin P, Robert C. 2012.** Cellular and molecular characterization of the impact of laboratory setup on bovine *in vitro* embryo production. *Theriogenology* 77: 1767-1778. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.12.021

25. **Pontes JH, Silva KC, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GM, Sanches BV, et al. 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: 1349-1355. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.004
26. **Pontes JHF, Melo FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KCP, Seneda MM. 2011.** Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 75: 1640-1646. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.12.026
27. **Rasmussen S, Block J, Seidel GE, Brink Z, McSweeney K, Farin PW, Bonilla L, et al. 2013.** Pregnancy rates of lactating cows after transfer of *in vitro* produced embryos using X-sorted sperm. *Theriogenology* 79: 453-461. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.10.017
28. **Rath D, Barcikowski S, de Graaf S, Garrels W, Grossfeld R, Klein S, Knabe W, et al. 2013.** Sex selection of sperm in farm animals: status report and developmental prospects. *Reproduction* 145: 15-30. doi: 10.1530/REP-12-0151
29. **Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Oliveira JA, Vantini R. 2001.** Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal recovery. *Anim Reprod Sci* 67: 37-43.
30. **Smith LC, Olivera-Angel M, Groome NP, Bhatia B, Price CA. 1996.** Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle. *J Reprod Fertil* 106: 193-199.
31. **Stinshoff H, Krienke M, Ekhlas-Hundrieser M, Wilkening S, Hanstedt A, Frese D, Rath D, et al. 2012.** Seminal plasma and seminal plasma proteins added to bulk sorted sperm do not alter the mRNA expression of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* 78: 132-139. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.01.028
32. **Sugimura S, Akai T, Imai K. 2017.** Selection of viable *in vitro*-fertilized bovine embryos using time-lapse monitoring in microwell culture dishes. *J Reprod Develop* 63: 353-357. doi: 10.1262/jrd.2017-041
33. **Tanno PH. 2009.** Estudo das alterações morfo-funcionais de espermatozoides bovinos submetidos à sexagem por meio da técnica de citometria de fluxo. Tesis de Maestría. Sao Paulo, Brasil: Universidade de São Paulo. 100 p.
34. **Viana JH, Siqueira LG, Palhao MP, Camargo LSA. 2012.** Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. *Anim Reprod* 9: 12-18.
35. **Wright J. 1998.** Photomicrographic illustration of embryo codes. In: Stringfellow DA, Seidel SM (eds). *Manual of the international embryo transfer society*. 3rd ed. Savory, IL: IETS. p167-170.
36. **Xu J, Chaubal SA, Du F. 2009.** Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology* 71: 39-47. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.012
37. **Zhang M, Lu KH, Seidel GE. 2003.** Development of bovine embryos after *in vitro* fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology* 60: 1657-1663. doi: 10.1016/S0093-691X(03)00177-8