



Efecto de eCG sobre la producción de embriones *in vitro* en bovinos de razas de carne en trópico seco

Lizeth M. Medina Pérez , Francisco J. Gutiérrez  , Francisco J. Trejo¹ , H. del Ángel¹,
Alejandro Espinoza Canales , Alberto Muro Reyes , Arnoldo González Reyna²  

Universidad Autónoma de Zacatecas, México.

Effect of eCG on *in vitro* embryo production in beef cattle in the dry tropics

Abstract. The effect of equine chorionic gonadotropin (eCG) was evaluated on follicular development and oocyte morphology through follicular aspiration (OPU) and its relationship with *in vitro* production of embryo in beef cows. Nine *Bos taurus* and *Bos indicus* cows were used, cows were 3 to 7 years old, with an average weight of 700 (± 120) kg, these cows were subjected to OPU according to the experimental protocol. The cows were kept in buffel grass (*Cenchrus Ciliaris* sp.) with mineral and food supplementation. The cows were divided in 4 groups, with a structural nested design, 3 different breeds x 4 eCG dosages (0 UI, 1000 UI, 2000 UI and 3000UI), with 3 repetitions per dosage. The ovarian cycle was synchronized with an intravaginal device (CIDR-B®, 1.9 g) and 0.7 ml estradiol benzoate, for 7 days, plus corresponding dosage of eCG, followed by OPU at CIDR withdrawal. After every OPU session, the oocytes were washed and was evaluated and incubated with *In Vitro* maturation media (MIV) in an Eve incubator, at 38.5°C and 5% of CO₂. After the MIV incubation, oocytes were placed in fertilization media (FIV) and fertilized; 18 hours post-fertilization, plates were placed in embryo incubation media (CIV) and incubated for a further 48 hours and the the media was changed and incubated for a further 96 hours. At this time, blastocyst rate was estimated. There were significant effects of breed ($P < 0.05$), however, eCG dose did not affect oocyte quality nor blastocyst rate.

Key words: eCG, Follicular aspiration guided by ultrasonography, Oocyte, blastocyst, *in vitro* embryo production.

Resumen. Se evaluó el efecto de la gonadotropina coriónica equina (eCG) sobre los ovocitos obtenidos mediante aspiración folicular (AF) y su relación con la producción de embriones *in vitro* en bovinos de razas de carne. Se utilizaron 9 vacas adultas *Bos taurus* y *Bos indicus* (3-7 años de edad), peso promedio de 700 (± 120) kg, las cuales se mantuvieron en zacate buffel (*Cenchrus ciliaris*, sp), con suplementación mineral y proteica. Las vacas se dividieron en 4 grupos, se utilizó un diseño factorial anidado, 3 razas x 4 dosis de eCG (0 IU, 1000 UI, 2000 UI y 3000 UI), con tres repeticiones por dosis. El ciclo ovárico se sincronizó con CIDR-B y 0.7 ml de benzoato de estradiol, durante 6 días; y la dosis de eCG, retiro de dispositivo y AF. Después de cada AF, los ovocitos se incubaron por 20-24 horas en gotas o placas, en medio MIV, cubiertas con aceite mineral, a 38.5 °C y 5% de CO₂. Después de 18 horas, se fecundaron, y enseguida se cambió el medio de cultivo para embriones (CIV) y se incubaron durante otras 48 horas; al final del periodo, se estimó la tasa inicial de fecundación (%), permaneciendo otros cuatro días (96 horas). Al día 7, se estimó la producción y calidad final de blastocitos. Se observaron efectos significativos ($P < 0.05$) debido a raza, mientras que el efecto de dosis no fue significativo, sobre el número y tipo de ovocitos o el número de blastocitos.

Palabras clave: eCG, aspiración folicular guiada por ultrasonografía, ovocitos, blastocitos, producción de embriones *in vitro*.

¹Laboratorio FIV, Unión Ganadera Regional de Tamaulipas, México.

²Universidad Autónoma de Tamaulipas. Autor para la correspondencia: aglezr1952@gmail.com

Efeito do eCG na produção *in vitro* de embriões em bovinos de corte nos trópicos secos

Resumo. Foi avaliado o efeito da gonadotrofina coriônica equina (eCG) em oócitos obtidos por aspiração folicular (AF) e sua relação com a produção *in vitro* de embriões em bovinos de corte. Foram utilizadas nove vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* adultas (3-7 anos de idade), com peso médio de 700 (\pm 120) kg, mantidas em capim buffel (*Cenchrus ciliaris*, sp), com suplementação mineral e proteica. As vacas foram divididas em 4 grupos, foi utilizado um planejamento fatorial aninhado, 3 raças x 4 doses de eCG (0 UI, 1000 UI, 2000 UI e 3000 UI), com três repetições por dose. O ciclo ovariano foi sincronizado com CIDR-B e 0,7 ml de benzoato de estradiol, por 6 dias; e dose de eCG, remoção do dispositivo e FA. Após cada AF, os oócitos foram incubados por 20-24 horas em gotas ou placas, em meio MIV, coberto com óleo mineral, a 38,5 °C e 5% de CO₂. Após 18 horas, foram fecundados, sendo imediatamente trocado o meio de cultura para embriões (CIV) e incubados por mais 48 horas; ao final do período, estimou-se a taxa inicial de fertilização (%) permanecendo mais quatro dias (96 horas). No dia 7, a produção e a qualidade final dos blastocistos foram estimadas. Efeitos significativos ($P < 0,05$) foram observados devido à raça, enquanto o efeito da dose não foi significativo, no número e tipo de ovócitos ou no número de blastos.

Palavras-chave: eCG, aspiração folicular guiada por ultrassonografia, oócitos, blastocistos, produção *in vitro* de embriões.

Introducción

El aprovechamiento ineficiente de los recursos genéticos de ganado bovino de alto potencial productivo, ha sido reconocido como una limitante de gran impacto en la ganadería de muchos países, con el fin de superar estas limitantes se ha optado por el uso de nuevas biotecnologías reproductivas como la AF, una técnica reportada previamente (Callesen *et al.*, 1987; Pieterse *et al.*, 1988); la cual ha sido con éxito en varios países (Trejo *et al.*, 2020; Watanabe *et al.*, 2017), la cual ha demostrado ser exitosa y reproducible para la obtención de oocitos a partir de vacas y vaquillas, y que es acoplada a la producción *in vitro* de embriones, es más económica que la superovulación y la transferencia de embriones convencionales (Bousquet *et al.*, 1999). De acuerdo con los datos de la International Embryo Transfer Society (IETS) en el año 2013 el número de embriones producidos mediante la técnica (FIV) y transferidos a receptoras fueron un total de 546.628 embriones a nivel mundial. Siendo Brasil el país con la mayor producción (Block *et al.*, 2011). La producción de embriones *in vitro*

en su conjunto implica la maduración, fecundación de ovocitos, y el cultivo hasta el estado de blastocito en el día 7 (Quispe, *et al.*, 2015), Sin embargo, la tasa de producción *in vitro* de blastocitos, todavía permanece baja, en la mayoría de los protocolos solamente entre 15 y 50% de los ovocitos alcanzan este estadio (Quispe *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que el uso de estímulos hormonales antes de AF favorece a animales de baja actividad folicular, como alternativa se encuentra el uso de la gonadotropina coriónica equina (eCG), la cual tiene efecto positivo en los tratamientos superovulatorios utilizados en la transferencia de embriones, realizando modificaciones de las dosis del tratamiento de cada animal. La eCG estimula el crecimiento folicular a través de su acción de hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), aumenta el tamaño del folículo, incrementará las concentraciones plasmáticas de progesterona, y mejorará la calidad del oocito y el desarrollo embrionario (Baruselli *et al.*, 2019).

Materiales y Métodos

El estudio se realizó en el Centro de Desarrollo de Capacidad Productiva y Mejoramiento Genético de la Unión Ganadera Regional de Tamaulipas, ubicado en las coordenadas 23°44'06" N; 99°07'51" O, a 327 msnm, con un clima semi-seco con lluvias en verano BS1 (h') hw, precipitación media mensual de 62.25 mm, temperatura máxima de 45 °C y una mínima de 20 °C durante el verano y una humedad relativa promedio de 70 % (CNA, 2018). Se utilizaron 9 vacas adultas, de razas *Bos taurus* (Europeas, Angus Rojo) *Bos indicus* (Cebuinas, Brahman) y sintéticas (Simbrah y Brangus Rojo), de 3 a 7 años de

edad, con un peso promedio de 700 (\pm 120) kg, y una condición corporal de 5 a 8 en (Escala de 1, vaca emaciada a 10, vaca obesa), con edades de 3 y 7 años. Las vacas se mantuvieron en praderas de zacate buffel (*Cenchrus ciliaris*, sp), con suplementación mineral y alimenticia, para mantenimiento. El ciclo ovárico de las vacas fue sincronizado mediante el uso de un dispositivo intravaginal con progesterona (CIDR-B®, 1.9 mg), en un protocolo que consistió en la inserción vaginal del dispositivo y la aplicación de 0.7 ml de benzoato de estradiol en el día 0, durante 5 días; más la aplicación de

la dosis correspondiente de eCG en el día 5, y retiro de dispositivo y AF el día 5. Las vacas se dividieron en 4 grupos, bajo un diseño factorial anidado, 3 razas x 4 dosis de eCG (0 IU, 1000 UI, 2000 UI y 3000 UI), con tres repeticiones por dosis. Los tratamientos representaron las siguientes características Testigo= sin dosis de eCG; T1=Dispositivo de progesterona el día 0 + benzoato de estradiol + 1000UI de eCG día 3 + retiro de dispositivo y aspiración folicular el día 5 ,T2= Dispositivo de progesterona el día 0 + benzoato de estradiol + 2000UI de eCG día 3 + retiro de dispositivo y aspiración folicular guiada por ultrasonido el día 5, T3= Dispositivo de progesterona el día 0 + benzoato de estradiol + 3000UI de eCG día 3 + retiro de dispositivo y aspiración folicular guiada por ultrasonido (AF) el día 5.

Se utilizó el método de AF, previamente descrito (Callesen *et al.*, 1987, Pieterse *et al.*, 1988), modificado (Watanabe *et al.*, 2017) y validado por Trejo *et al.* (2020).

Resultados

Se evaluó el efecto de la eCG sobre la calidad morfológica de ovocitos obtenidos mediante AF y su relación con la producción de embriones *in vitro* en bovinos de razas de carne (*Bos taurus*, *Bos indicus* y sintéticas), las cuales fueron sometidas a la aspiración folicular guiada por ultrasonografía (OPU), según el protocolo experimental, obteniendo como resultado; efectos significativos ($P<0.05$) de acuerdo al biotipo (raza) mientras que el efecto de dosis no fue significativo, sobre el número y tipos de ovocitos y el número de blastocitos.

En el Cuadro 1 Se muestran los resultados obtenidos de vacas de razas de carne de diferentes biotipos (cebuinas, sintéticas y europeas) tratadas con diferentes dosis de gonadotropina coriónica equina (eCG), de acuerdo al biotipo, se expresan efectos significativas ($P<0.05$), donde las vacas cebuinas tuvieron el mayor porcentaje de ovocitos totales media = 37.1 pero no de ovocitos viables comparado con las sintéticas quienes obtuvieron el valor más alto media= 18.7 a lo contrario con las europeas con porcentajes más bajos en cuanto a ovocitos totales 22.1 , ovocitos viables 11.9, ovocitos desnudos 5.3 , degenerados y atrésicos 6.3 y por consecuente a la producción de blastocitos 4.6. Se encontraron diferencias significativas de acuerdo al biotipo (raza), mientras que el efecto dosis no fue significativo para las tres razas, comparado con el tratamiento testigo en el cual se

El método consiste en aspirar los oocitos, se lavan, evalúan y maduran en medio de maduración (MIV, Vitrogen, Brasil) durante 24 horas, en una incubadora Eve (WTA, Brasil), posteriormente, se fecundan, con 7-10 ul de espermatozoides vivos, concentrados (10-12,000 espermatozoides), se incuban en medio de fecundación (FIV), se incuban durante 48 horas, se cambia nuevamente el medio FIV por un medio de incubación de cultivo de embriones (CIV, Vitrogen, Brasil); posteriormente, se incuban por un periodo de 96 horas y finalmente, se realiza la evaluación de producción de blastocitos (Trejo *et al.*, 2020).

Los datos fueron analizados utilizando un diseño factorial 3 (biotipos, Brahman, Angus Rojo y Simbrah y Brangus Rojo) x 4 (dosis, 0, 1000, 2000 y 3000 UI), con $n=3$, en un arreglo anidado o cruzado, para las dosis donde las vacas fueron sus propias repeticiones (SAS, 2004). Las diferencias entre medias se compararon mediante la comparación múltiple de medias a $P<0.05$

muestras porcentajes más altos en lo que respecta ovocitos viables con una media 30.3 y ovocitos totales con una media de 19.2, en diferencia del tratamiento T1, T2, T3 en donde el número de ovocitos desnudos y producción de blastocitos fue numéricamente mayor en vacas sintéticas y europeas; sin embargo, la producción de blastocitos fue igual para el T0 y T2 en la desviación estándar. También se observaron efectos significativos de acuerdo al biotipo (raza) ($P<0.05$) donde las razas cebuinas obtuvieron una media de 38.8 demostrando diferencias significativas en los tratamientos T2 y T3 en lo que respecta la tasa de blastocitos, mientras que las razas sintéticas manifestaron la mayor producción de blastocitos con una media de 41.7, comparado con las europeas las cuales a pesar de su bajo contenido de ovocitos totales y viables lograron fecundarse más de la mitad teniendo una media de 41.4 observándose diferencias significativas para el tratamiento T0 y T1.

La tasa de blastocitos para las razas sintéticas y europeas fue mayor con el tratamiento T1, mientras que para las razas cebuinas resultó mejor el tratamiento T2, en lo que respecta el tratamiento T3, numéricamente se observaron efectos significativos para las razas europeas observando la menor tasa de blastocitos con una media de 27.0 comparada con los demás tratamientos.

Cuadro 1. Número* de ovocitos y blastocitos (Media \pm ESM) obtenidos en vacas de razas de carne de diferentes biotipos (raza) tratadas con CIDR (5días) y diferentes dosis de gonadotropina coriónica equina (eCG), de acuerdo al biotipo.

Biotipo y dosis §	Ovocitos totales	Ovocitos viables	Ovocitos desnudos	Ovocitos degenerados y atrésicos	Blastocitos
Cebú, n=3					
0 UI	47.0(8.0) ^a	33.7(3.8) ^a	11.0 (4.9) ^a	3.7 (1.7)	9.9 (5.7) ^a
1000 UI	38.3(6.7) ^a	13.7(3.5) ^b	14.7 (5.3) ^a	10.0 (1.5)	5.3 (1.2) ^a
2000 UI	33.7(3.4) ^a	12.0(4.2) ^b	13.3 (4.1) ^a	8.3 (3.8)	7.0 (1.0) ^a
3000 UI	29.3(11.8) ^a	11.7(6.7) ^b	5.7 (1.5) ^b	12.0 (5.9)	6.3 (2.7) ^a
Media	37.1	17.8	11.2	8.5	6.9
ESM	3.3	5.3	2.0	1.8	0.8
Sintéticas, n=3					
0 UI	33.7 (6.9) ^a	20.0(3.5) ^a	3.7 (0.7) ^a	10.3 (5.8)	7.0 (2.3) ^a
1000 UI	33.3 (6.7) ^a	20.0(3.5) ^a	6.0 (4.5) ^a	6.3 (3.2)	10.0 (0) ^a
2000 UI	36.7(13.2) ^a	20.0(10.2) ^a	3.7 (1.8) ^a	12.0 (3.4)	8.0 (2.3) ^a
3000 UI	24.3 (7.2) ^a	15.0 (4.6) ^a	4.3 (2.4) ^a	6.0 (0.9)	6.3 (2.2) ^a
Media	32.0	18.7	4.9	8.6	7.8
ESM	2.7	1.3	1.0	1.5	0.8
Europeas, n=3					
0 UI	10.3 (2.9) ^a	4.0 (1.0) ^a	2.0 (0.6) ^a	5.0 (1.7)	1.7 (0.6) ^a
1000 UI	8.3 (8.2) ^a	1.7 (0.7) ^a	2.7 (0.9) ^a	5.0 (1.5)	1.0 (0) ^a
2000 UI	8.3 (2.9) ^a	2.0 (0.6) ^a	1.0 (0) ^a	6.0 (2.5)	1.0 (0) ^a
3000 UI	7.7 (1.8) ^a	3.3 (1.3) ^a	1.0 (0) ^a	4.0 (1.0)	1.0 (0) ^a
Media	8.7	2.9	1.7	4.4	1.2
ESM	0.6	0.6	0.4	0.7	0.2
Medias Totales					
Media	22.1	11.9	5.3	6.3	4.6
ESM	7.5	4.5	2.2	1.7	1.7

*Se observaron efectos significativos ($P < 0.05$) biotipo (raza), mientras que el efecto de dosis no fue significativo, sobre el número y tipos de ovocitos y el número de blastocitos.

§ Literal diferente dentro de cada casilla indica diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias.

Discusión

La producción de embriones *in vitro* es una biotecnología desarrollada para obtener crías de animales de producción de alto valor genético (Palmer *et al.*, 1991). La técnica en su conjunto implica la maduración *in vitro* de ovocitos (MIV), fecundación *in vitro* de ovocitos (FIV) y el cultivo *in vitro* de oocitos fecundados (CIV) hasta el estado de blastocisto (día 7). Para la recuperación de ovocitos de animales vivos generalmente se ha utilizado la técnica de AF, la cual ha sido previamente descrita (Callesen *et al.*, 1987; Pieterse *et al.*, 1988), dicha metodología combinada con la fecundación *in vitro* (FIV) permiten conformar un sistema de bajo costo de producción de embriones en bovinos (Watanabe *et al.*, 2017). Existen numerosos reportes relacionados con la recolección de ovocitos, sin necesidad de utilizar algún tipo de estimulación hormonal (Pieterse *et al.*, 1991); sin embargo, se han encontrado en algunos animales baja actividad ovárica (Bousquet *et al.*, 1999) en los cuales es

necesario utilizar una combinación de FSH o de gonadotropina eCG, las cuales se conoce tienen un efecto positivo en los tratamientos superovulatorios.

Los resultados obtenidos en presente estudio, demostraron efectos significativos ($P < 0.05$) de acuerdo al biotipo (raza), mientras que el efecto de dosis no fue significativo, sobre el número y tipos de ovocito y el número de blastocitos. Evans *et al.* (2012) señalan que la calidad y cantidad de ovocitos bovinos se ve afectada por el tipo de ganado, es así como en animales procedentes del *Bos taurus* las tasas de fecundación son menores que en las hembras procedentes del *Bos indicus*. En los resultados obtenidos de acuerdo a la dosis de eCG; se muestran diferencias significativas de acuerdo al biotipo (raza), mientras que el efecto dosis no fue significativo para las tres razas, comparado con el tratamiento testigo en el cual se muestran porcentajes más altos en lo que respecta

ovocitos viables con una media 30.3 y ovocitos totales con una media de 19.2, en diferencia del tratamiento T1, T2, T3 en donde el número de ovocitos desnudos y producción de blastocitos fue numéricamente mayor en vacas sintéticas y europeas, sin embargo, la producción de blastocitos fue igual para el T0 y T2 en la desviación estándar. Existen diversos factores que pueden influenciar el número de ovocitos recolectados, tales como los tratamientos hormonales, la frecuencia de la aspiración, la presión de vacío, el tamaño de los folículos y la raza (Hasler, 2010; Mapletoft *et al.* 2002; Merton *et al.* 2003; Quispe *et al.* 2015) mencionan además que la producción de embriones depende de factores, como, la respuesta superovulatoria de la donadora y la preparación

de las gonadotropinas y factores del medio ambiente, que rodean a la donadora.

En cuanto a la tasa de blastocitos (%) se observaron efectos significativos ($P < 0.05$) de acuerdo al biotipo (raza), donde las razas cebuinas obtuvieron una media de 38.8 demostrando diferencias significativas en los tratamientos T2 y T3 en lo que respecta la tasa de blastocitos, mientras que las razas sintéticas manifestaron la mayor producción de blastocitos con una media de 41.7, comparado con las europeas las cuales a pesar de su bajo contenido de ovocitos totales y viables lograron fecundarse más de la mitad teniendo una media de 41.4 observándose diferencias significativas para el tratamiento T0 y T1,

Conclusión

De acuerdo a la dosis de eCG, la tasa de blastocitos (%) para las razas sintéticas y europeas fue mayor con el tratamiento T1, mientras que para las razas cebuinas resulto mejor el tratamiento T2, numéricamente se

observaron efectos significativos en lo que respecta el tratamiento T3 para las razas europeas donde obtuvieron la menor tasa de blastocitos con una media de 27.0 comparada con los demás tratamientos.

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés

Literatura Citada

- Baruselli, P. S., B. L. C. Catussi, L. A. De Abreu, F. M. Elliff, L. G. Da Silva, and E. O. S. Batista. 2019. Challenges to increase the AI and ET markets in Brazil. *Animal Reproduction*, 16(3):364-375. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0050>
- Block, J., P. J. Hansen, B. Loureiro, and L. Bonilla. 2011. Improving post-transfer survival of bovine embryos produced *in vitro*: Actions of insulin-like growth factor-1, colony stimulating factor-2 and hyaluronan. *Theriogenology*, 76 (9):1602-1609. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.025>
- Bousquet, D., H. Twagiramungu, N. Morin, C. Brisson, G. Carboneau, and J. Durocher. 1999. *In vitro* embryo production in the cow: An effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*, 51:59-70. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00231-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00231-3).
- Callesen, H., T. Greve, and F. Christensen. 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular aspiration. *Theriogenology*, 27:217 (Abstract).
- Comisión Nacional del Agua. (CNA). 2018. Disponible en: <http://smn.cna.gob.mx/es/informacion-climatologica-ver-estado?estado=tamps>
- Evans, A. C. O., F. Mossa, S. W. Walsh, D. Scheetz, F. Jimenez-K., J. F. H. Ireland, G. W. Smith, and J. J. Ireland. 2012. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(S4):31-37. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x>
- Mapletoft, R. J., K. Bennett Steward, and G. P. Adams. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction, Nutrition and Development*, 42:601-611. <https://doi.org/10.1051/rnd:2002046>
- Merton. J. S., A. P. W. de Roos, E. Mullaart, L. de Ruigh. L. Kaal, P. L. A. M. Vos, and S. J. Dielemen. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59(2):651-674. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01246-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01246-3)
- Pieterse, M. C., K. A. Kappen, M. Kruij, and M. Taverne. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of ovaries. *Theriogenology*, 30:751-762. doi: 10.1016/0093-691X(88)-90310-X.

- Quispe, C., E. Fernández, E. Ancco, K. Oriundo, y E. Mellisho. 2015. Efecto de la raza de la donadora sobre la cantidad y calidad de ovocitos recuperados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía transvaginal. *Spermova* 5: 59-62. doi: 10.18548/aspe/0002.13
- S. A. S. 2004. Statistical Analysis System, Statistics Visual, Version 8.1. SAS Institute, Inc. Campus Drive, Cary, NC, E. U. A.
- Trejo Meza, F. J., Y. Bautista Martínez, M. Ruiz Albarrán, E. A. López Acevedo y A. González Reyna. 2020. El efecto de la raza de la donadora sobre la producción de embriones *in vitro* bajo condiciones de trópico seco del noreste de México. In: Producción de embriones de donadoras de bovinos de carne en el trópico seco de México, A. González Reyna (Ed.), Edit. Acad. Esp., Beau Basín, Mauritius, pp. 69-156. ISBN 978-620-0-43029-8.
- Watanabe, Y. F., Souza, A. H., Mingoti, R.D., Ferreira, R. M., Batista, E. O. S., Dayan. A., Watanabe, O., Meirelles, F. V, Nogueira, M. F. G., Ferraz, J. B. S., Baruselli, P.S. 2017. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with *in vitro* embryo production and field fertility following embryo transfer. *Animal Reproduction* 14(3):635-644. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR1008>.