

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
FACULTAD DE ZOOTECNIA**



**“SELECCIÓN MORFOCINÉTICA DE EMBRIONES
BOVINOS CON CAPACIDAD DE IMPLANTACIÓN”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO
ZOOTECNISTA**

SHEZIRA PAMELLA ROJAS MEDINA

LIMA – PERU

2024

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente
investigación (Art. 24 – Reglamento de Propiedad Intelectual)**

SELECCIÓN MORFOCINÉTICA DE EMBRIONES BOVINOS CON CAPACIDAD DE IMPLANTACIÓN

INFORME DE ORIGINALIDAD

3%

INDICE DE SIMILITUD

2%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

Edwin Mellisho

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	1%
2	docplayer.es Fuente de Internet	<1%
3	repositorio.udec.cl Fuente de Internet	<1%
4	core.ac.uk Fuente de Internet	<1%
5	www.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	<1%
6	Submitted to University of Auckland Trabajo del estudiante	<1%
7	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1%
8	Giovanni Coticchio, Giulia Fiorentino, Giovanna Nicora, Raffaella Sciajno et al. "Harnessing cytoplasmic particles movement of the human early embryo analysed by	<1%

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE ZOOTECNIA

**“SELECCIÓN MORFOCINÉTICA DE EMBRIONES
BOVINOS CON CAPACIDAD DE IMPLANTACIÓN”**

Presentado por:

SHEZIRA PAMELLA ROJAS MEDINA

TESIS PARA OPTAR TÍTULO DE INGENIERO ZOOTECNISTA

Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado:

Mg.Sc. Enrique Alvarado Malca

Presidente

Ing. Amalia Gallegos Cárdenas

Miembro

Mg.Sc.. Segundo Gamarra Carrillo

, Miembro

Dr. Edwin Mellisho Salas

Asesor

DEDICATORIA

A mi madre Maria Medina por enseñarme a nunca rendirme y por todo el apoyo incondicional que siempre me ha brindado. A mi padre, Jose Rojas por enseñarme su determinación y compromiso en el ámbito familiar y laboral. A mis hermanos, por siempre creer mí y apoyarme en todo momento. A mi hermana, Natalia Rojas por demostrarme que la edad no te define. A Fabricio Moncada, por el apoyo incondicional y por siempre impulsarme a seguir adelante. A toda mi familia, ya que sin ellos nada de esto sería posible.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis al PhD Edwin Mellisho Salas, por el apoyo y la orientación para la realización de esta tesis durante todo este tiempo.

A los miembros del jurado evaluador: Mg.Sc. Enrique Alvarado Malca, Ing. Amalia Gallegos Cárdenas, M.V. Segundo Gamarra Carrillo por su apoyo en la elaboración de la presente tesis.

Al laboratorio Centro de Investigación en Tecnología de Embriones (CIETE) de la facultad de Zootecnia, de la Universidad Nacional Agraria La Molina, por permitirme realizar el trabajo experimental.

A mis compañeros por el apoyo y experiencias vividas.

Este trabajo fue financiado por el CONCYTEC-PROCIENCIA en el marco de la convocatoria Proyectos de Investigación Aplicada y Desarrollo Tecnológico 2020-02 - Fase II [Contrato N° 143-2020-FONDECYT]”

ÍNDICE

I	INTRODUCCIÓN	1
II	REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
2.1	Desarrollo embrionario temprano	3
2.1.1	Primera división embrionaria	3
2.1.2	Activación del genoma embrionario.....	5
2.1.3	Primera diferenciación celular	6
2.1.4	Eclosión del blastocisto	7
2.1.5	Elongación del blastocisto	9
2.1.6	Reconocimiento materno – embrionario	10
2.2	Métodos en la selección de embriones	11
2.2.1	Morfología	12
2.2.2	Morfocinética.....	14
2.2.3	Marcadores moleculares	20
2.3	Métodos de recuperación de ovocitos	22
2.3.1	Ovocitos de vacas en matadero.....	23
2.3.2	OPU- Ultrasonografía.....	24
2.3.3	OPU-Laparoscopia	26
2.4	Producción de embriones	27
2.4.1	Producción de embriones <i>in vivo</i>	28
2.5	Producción de embriones <i>in vitro</i>	30
2.6	Factores que afectan la transferencia de embriones	32

III	METODOLOGÍA	36
3.1	Lugar y animales	36
3.2	Diseño experimental.....	36
3.3	Preparación de donadoras: sincronización y superestimulación de ovocitos.....	40
3.4	Producción de embriones <i>in vitro</i> en bovinos	40
3.5	Sincronización, transferencia y diagnóstico de preñez de receptoras	42
3.6	Análisis estadístico	43
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
4.1	Evaluación morfocinética del desarrollo embrionario a blastocisto	44
4.2	Producción de embriones <i>in vitro</i> a partir de donantes no superestimuladas.....	46
4.3	Producción de embriones <i>in vitro</i> a partir de donantes superestimuladas.....	48
4.4	Tasa de preñez de embriones <i>in vitro</i> a partir donantes de razas lechera con/sin superestimulación	50
4.5	Validación del modelo matemático para determina implantación	52
V	CONCLUSIONES	56
VI	RECOMENDACIONES	57
VII	BIBLIOGRAFÍA.....	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Momento de la primera división de embriones <i>in vitro</i> en vacunos (modificado de Lechniak <i>et al.</i> , 2008).....	4
Tabla 2.	Criterios morfológicos para clasificar embriones bovinos (Modificado de Stringfellow & Givens, 2010)	13
Tabla 3.	Tasa de preñez despues de la TE <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de embriones de calidad 1, 2 y 3 (Hasler <i>et al.</i> , 1995)	14
Tabla 4.	Tasa de preñez y calidad de embriones transferidos en el día 7 y 8 (Hasler <i>et al.</i> , 1995).....	14
Tabla 5.	Tiempo promedio de aparición de diferentes estados de desarrollo en bovinos observado por monitoreo del desarrollo (Benne <i>et al.</i> , 2021)	20
Tabla 6.	Marcadores moleculares en diferentes estados de desarrollo embrionario (Orozco-Lucero & Sirard, 2014).....	21
Tabla 7.	Influencia del tamaño de aguja en la aspiración de ovarios de matadero (Fry <i>et al.</i> , 1997).....	24
Tabla 8.	Efectos de la presión de vacío en la recuperación de ovocitos de ovarios del matadero (Sasamoto <i>et al.</i> , 2003).	24
Tabla 9.	Comparación de la capacidad de desarrollo de los cigotos y la tasa de preñez de embriones transferidos en vacas <i>bos taurus</i> superestimuladas con FSH y control (Kim & Yi, 2023).	26
Tabla 10.	Promedio de COCs aspirados por OPU- Laparoscopía en diferentes especies (Jorge Neto <i>et al.</i> , 2018).	27

Tabla 11.	Comparación de tasa de preñez con embriones producidos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (Pontes <i>et al.</i> , 2009).....	29
Tabla 12.	Producción de embriones <i>in vivo</i> con donadoras inseminadas con semen sexado y convencional (Hayakawa <i>et al.</i> , 2009)	30
Tabla 13.	Comparación de tasa de clivaje y blastocistos <i>in vitro</i> obtenidos de <i>Bos indicus</i> y <i>Bos taurus</i> fecundado con semen convencional y sexado (Contreras <i>et al.</i> , 2015)	32
Tabla 14.	Relación de diferentes variables que posiblemente influyen en la TE en la tasa de preñez en vacas nulíparas y múltiparas (Ferraz <i>et al.</i> , 2016).	34
Tabla 15.	Modelo predictivo no invasivo de viabilidad <i>in vitro</i> con el uso de regresión logística binaria.	39
Tabla 16.	Eficiencia de IVP a partir de donante de razas lecheras no superestimuladas	47
Tabla 17.	Eficiencia de producción de embriones <i>in vitro</i> a partir de donantes de razas lecheras superestimuladas tratadas con/sin somatotropina	49
Tabla 18.	Eficiencia de IVP a partir de donantes de razas lecheras superestimuladas.....	51
Tabla 19.	Predicción de la implantación embrionaria determinada con el tamaño del blastocisto al día 7.5 de transferencia a receptoras.....	53

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Organización de la cromatina y ensamblaje del huso en cigotos bovinos hasta embrión de dos células (Cavazza <i>et al.</i> , 2021).	3
Figura 2.	Diferenciales de expresión de genes desde cigoto hasta blastocisto (Graf <i>et al.</i> , 2014)	6
Figura 3.	Blastocistos con expresión de OCT4, mientras que las células de trofoectodermo tiene expresión específica de CDX2 (Cui <i>et al.</i> , 2019).	7
Figura 4.	Eclosión de blastocitos de la zona pelúcida a través del polo embrionario (a, b) y el polo abembrionario (c, d). El área rodeada por la línea punteada representa la masa celular interna. (Negrón-Pérez & Hansen, 2017).	8
Figura 5.	Embriones fecundados <i>in vivo</i> en etapa de elongación. Se muestran embriones representativos en los días 16, 18 y 20 (Hirayama <i>et al.</i> , 2014).	10
Figura 6.	Participación del interferón Tau en la activación y reclutamiento de células inmunitarias para una buena comunicación embrio-materna y el reconocimiento de la preñez (Bai <i>et al.</i> , 2012).	11
Figura 7.	Parámetros cuantitativos y cualitativos generados por monitoreo de time lapse, que pueden estar asociados a la formación exitosa de blastocisto bovino y preñez (Magata, 2023).	16
Figura 8.	Equipos de time lapse comerciales que registran datos e imágenes continuas de la morfocinética del embrión, cada equipo posee diferente capacidad de embriones.	18
Figura 9.	Comparación entre el desarrollo embrionario temprano de ratón, bovinos y humanos. (a) Fecundación; (b) formación pronuclear; (c) cigoto; (d) embrión de 2	

	células; (e) embrión de 4 células; (f) embrión de 8 células; (g) Mórula; (h) blastocisto temprano; (g) blastocisto (Rodríguez-Osorio <i>et al.</i> , 2012).....	19
Figura 10.	Número de embriones colectados en vacas en el periodo del 2002 al 2021 en los diferentes continentes (IETS, 2021)	28
Figura 11.	Número de embriones de ovocitos aspirados de vacas en el período de 2002 al 2021 en los diferentes continentes (IETS, 2021).....	30
Figura 12.	Factores que afectan el éxito reproductivo en bovinos (Nowicki, 2021)	33
Figura 13.	Cultivo de embriones en micropocillos (16 wells-vitrolife) desde cigoto al día 7.5.	37
Figura 14.	Diseño experimental de ovocitos de donantes no superovuladas, transferencia embrionaria y detección de preñez	38
Figura 15.	Diseño experimental de ovocitos de donantes no superovuladas y cultivo de embriones en micropocillos (16 wells-vitrolife) desde cigoto al día 7.5.....	39
Figura 16.	Tasa de división celular de embriones bovinos (A) y patrón de cinética embrionaria desde el cigoto hasta el blastocisto expandido usando monitoreo continuo con el equipo de time lapse	44
Figura 17.	Patrón de cinética de embriones bovinos y tiempo de formación de blastocistos expandidos medidos mediante un control continuo con ayuda del equipo de time lapse. A) Parámetros cinéticos de las divisiones celulares embrionarias t2, t3, t4, t5, t8, t9+, tM, tSB, tB y tBX.....	46

RESUMEN

La selección de embriones para transferencia con alta capacidad implantatoria es esencial para asegurar el éxito de la transferencia de embriones en bovinos. Sin embargo, el enfoque actual es considerado subjetivo e inadecuado debido a la variación significativa en la selección entre profesionales y laboratorios. El objetivo de este estudio fue evaluar patrones morfocinéticos del desarrollo embrionario *in vitro* para la selección basado en su capacidad implantatoria en bovinos. Para ello se realizaron 04 experimentos. Experimento 1, evaluación morfocinética del desarrollo embrionario a blastocisto. Experimento 2 y 3, comparación de la producción de embriones *in vitro* de donantes superestimuladas y no superestimuladas y experimento 4, validación del modelo matemático *in vitro* para la selección morfocinética de embriones bovinos con capacidad de implantación. En el experimento 1, se utilizaron ovarios de vacas de matadero local, se recuperaron ovocitos para ser madurados y fecundados *in vitro*. Los posibles cigotos fueron cultivados en placa de 16 micropocillos y se midieron tiempos a la división de 2 células (t2); 3 células (t3); 4 células (t4); 5 células (t5); 8 células (t8); a mórula (tM); a formación del Blastocisto (tB) y tiempo de blastocisto expandido (tBX). En experimento 2 y 3, donantes de raza Holstein y Brown Swiss fueron sometidas a sesiones de aspiración folicular guiada por ultrasonografía transvaginal previamente superovuladas (264 mg de FSH) y no superovuladas. Los blastocistos obtenidos fueron transferidos a receptoras previamente sincronizadas. El diagnóstico de preñez fue determinada a los 35 días post transferencia. En el experimento 4, la validación del modelo matemático *in vitro* para la selección morfocinética de embriones bovinos fue realizado con el diámetro del blastocisto a la transferencia (día 7.5) y la preñez determinada a 35 días post transferencia. Las variables respuesta fueron analizados según data del experimento con la prueba ANOVA (experimento 1,2 y 3) y prueba Kruskal-Wallis (experimento 4). En experimento 1, los resultados nos indica que el tiempo medio hasta la primera escisión y hasta los blastocitos expandidos fue de 32.94 y 182.09 h, respectivamente. Aunque, el tiempo a primera escisión se redujo a 29.98 h en embriones que arribaron a blastocisto expandido exitosamente. La producción de blastocistos por donantes Holstein no superestimuladas fue de 0.65 (hato 1) y 0.31 (hato 2). Sin embargo, la producción de blastocistos por donantes Holstein superestimuladas incremento a 2.60.

Los blastocistos *in vitro* transferidos al día 7.5 post IVF de donantes superestimuladas y no superestimuladas generaron una tasa de preñez de 10,42% y 24,24% respectivamente. En el experimento 4, los resultados de validación del modelo matemático no representaron la predicción de preñez con respecto del diámetro del embrión al día 7.5. En conclusión, la tecnología time lapse nos permite evaluar a detalle el desarrollo morfocinético de los embriones que podría ayudar a la selección de los embriones más competentes para preñez de receptoras. Asimismo, las donantes superestimuladas nos permitió recolectar más ovocitos y blastocistos por donantes. Aunque el modelo matemático no permito validar con precisión la tasa de preñez, requiriendo un mayor número de repeticiones que permita mayor precisión en los resultados.

PALABRAS CLAVE: Time lapse, morfocinética, implantación, blastocistos, embriones *in vitro*, superestimulación, bovinos.

ABSTRACT

The embryo selection for transfer with high implantation capacity is essential to ensure the success of embryo transfer in bovine. However, the current approach is considered subjective and inadequate due to significant variation in selection between professionals and laboratories. The objective of this study was to evaluate morphokinetic patterns of embryonic development *in vitro* for selection based on their implantation capacity in cattle. For this, 04 experiments were carried out. Experiment 1, morphokinetic evaluation of embryonic development to blastocyst. Experiment 2 and 3, comparison of the *in vitro* embryo production from superstimulated and non-superstimulated donors and experiment 4, validation of the *in vitro* mathematical model for the morphokinetic selection of bovine embryos with implantation capacity. The methodology in experiment 1, oocytes were recovered from the ovaries of local slaughterhouse cows to be *in vitro* matured and fertilization. The possible zygotes were cultured in a 16-microwell plate and times to the division of 2 cells (t2) were measured; 3 cells (t3); 4 cells (t4); 5 cells (t5); 8 cells (t8); a morula (tM); Blastocyst formation (tB) and blastocyst time expanded (tBX). In experiments 2 and 3, Holstein and Brown Swiss donors were subjected to transvaginal ultrasonography-guided follicular aspiration sessions previously superovulated (264 mg of FSH) and not superovulated. The blastocysts obtained were transferred to previously synchronized recipients. The pregnancy diagnosis was determined 35 days after embryo transfer. In experiment 4, the validation of the *in vitro* mathematical model for the morphokinetic selection of bovine embryos was carried out with the diameter of the blastocyst at transfer (day 7.5) and pregnancy of receptor. The response variables were analyzed according to the experiment data with the ANOVA test (experiment 1,2 and 3) and Kruskal-Wallis test (experiment 4). In experiment 1, the results indicate that the average time until the first cleavage and the expanded blastocysts were 32.94 and 182.09 h, respectively. Although, the time to first cleavage was reduced to 29.98 h in embryos that reached a successfully expanded blastocyst. The blastocyst production by non-superstimulated Holstein donors was 0.65 (herd 1) and 0.31 (herd 2). However, blastocyst production by superstimulated Holstein donors increased until 2.60. *In vitro* blastocysts transferred at day 7.5 post IVF from superstimulated and non-superstimulated donors generated a pregnancy rate of 10.42% and 24.24% respectively. In experiment 4, the validation results of the mathematical model did not represent the prediction of

pregnancy with respect to embryo diameter at day 7.5. In conclusion, time-lapse technology allows us to evaluate in detail the morphokinetic development of embryos, which could help in the selection of the most competent embryos for pregnancy of recipients. Likewise, superstimulated donors allowed collect more oocytes and blastocysts per donor. Although the mathematical model does not allow the pregnancy rate to be precisely validated, requiring a greater number of repetitions to allow greater precision in the results.

KEYWORDS: Time lapse, morphokinetics, implantation, blastocysts, *in vitro* embryos, superstimulation, bovine.

I INTRODUCCIÓN

La producción de embriones *in vitro* (IVP) se desarrolló como una alternativa a la ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET). La IVP comprende una serie de procesos que incluyen la maduración, fecundación y cultivo *in vitro*. Estos procesos intentan simular las condiciones que ocurren *in vivo* para proporcionar embriones de calidad, capaces de un desarrollo e implantación continuo y que den como resultado crías viables (Meirelles *et al.*, 2004). La eficiencia de producir embriones y las tasas de preñez de los embriones *in vitro* son variables y menores a los producidos *in vivo* (Findikli & Oral, 2014).

En el año 2019 las estadísticas de la Sociedad Internacional en Tecnología de Embriones (IETS) reportaron una producción total de 1.480.821 embriones transferibles, siendo la proporción de embriones producidos *in vitro* de 72.7% (1, 031,769), superando largamente al número de embriones producidos *in vivo* (387,769; 27,3%) (IETS, 2021). En condiciones *in vitro*, el 20-40% de los posibles cigotos cultivados alcanzarán la etapa de blastocisto (Lonergan *et al.*, 2001; Rizos *et al.*, 2008). Esta baja tasa de blastocistos obtenida en los procedimientos *in vitro*, posiblemente se deba al resultado de la exposición de los embriones a cambios de pH, temperatura y luz que pueden causar efectos negativos sobre su calidad y desarrollo (Merton *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2010). Otras razones para esta baja tasa de blastocistos podría ser: una maduración citoplasmática incompleta de los ovocitos y condiciones de cultivo inadecuadas que conducen a una activación del genoma embrionario deficiente o a una fragmentación del ADN (Sirard *et al.*, 2006). Por otro lado, algunos reportes han evidenciado que las tasas de preñez post transferencia siguen siendo bajas en bovinos 35% (Masuda *et al.*, 2021) y así mismo en humanos 30 % (Basile *et al.*, 2019).

Elegir el embrión para transferencia con capacidad de implantación es esencial para asegurar la mayor probabilidad de lograr la preñez (Van den Abbeel *et al.*, 2013). Actualmente, la selección embrionaria se basa en las características morfológicas (estado de desarrollo y calidad) atribuido al tiempo post fecundación en humanos (Kirkegaard *et al.*, 2015) y en bovinos (Hoelker *et al.*, 2013). Sin embargo, este enfoque es considerado subjetivo e inadecuado debido a la variación

significativa entre profesionales y laboratorios (Sugimura *et al.*, 2017). Estas consideraciones exigen a los embriólogos implementar estrategias de selección embrionaria que incluya características objetivas para identificar aquellos con el mayor potencial de implantación (Basile *et al.*, 2019). Existen otras técnicas en la selección de los embriones en bovinos, que implican el uso de biomarcadores moleculares, medición del metabolismo embrionario y monitoreo del desarrollo embrionario (Rocha *et al.*, 2016). Esta última puede representar una forma superior de seleccionar embriones *in vitro* (Kieslinger *et al.*, 2016), debido a que aumenta el número de observaciones proporcionando una mejor información sobre el desarrollo del embrión para una mejor evaluación embrionaria (Basile *et al.*, 2019).

El monitoreo del desarrollo embrionario permite la cuantificación de la cinética celular y los eventos del ciclo celular (Magata *et al.*, 2019). Estudios sugieren que hay una relación entre el patrón de eclosión de los blastocistos y la viabilidad de los embriones después de la transferencia (Niimura *et al.*, 2010). Además, en humanos, una blastulación temprana tiene una correlación positiva con la preñez (Capalbo *et al.*, 2014; Shapiro *et al.*, 2008).

El objetivo principal de este estudio fue evaluar patrones morfocinéticos de desarrollo embrionario para la selección basado en su capacidad implantatoria en bovinos. Teniendo como objetivos secundarios; i) Evaluar el desarrollo morfocinética de embriones bovinos *in vitro*, ii) Comparar la producción de embriones *in vitro* de donantes superestimuladas y no superestimuladas, iii) Validar el modelo matemático para la selección morfocinética de embriones bovinos con capacidad de implantación.

II REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Desarrollo embrionario temprano

El desarrollo embrionario temprano comprende desde la etapa del cigoto hasta blastocisto, la regulación en los mamíferos es un proceso complejo, pero, determinan su destino (Yaacobi-Artzi *et al.*, 2022). En las cuales, las etapas claves son:

2.1.1 Primera división embrionaria

El ovocito en el momento de la ovulación se encuentra en la etapa de metafase de la segunda división meiótica (Machaty *et al.*, 2017). La fecundación reinicia la meiosis y el ciclo celular, generando un cigoto (Wamaitha & Niakan, 2018). Luego de la fecundación, los cromosomas maternos y paternos quedan encerrados en dos pronúcleos separados en la periferia del cigoto. Los pronúcleos migran al centro del cigoto donde se encuentran sometidos a ruptura de la envoltura nuclear y división celular (Cavazza *et al.*, 2021), este proceso se muestra en la figura 1.

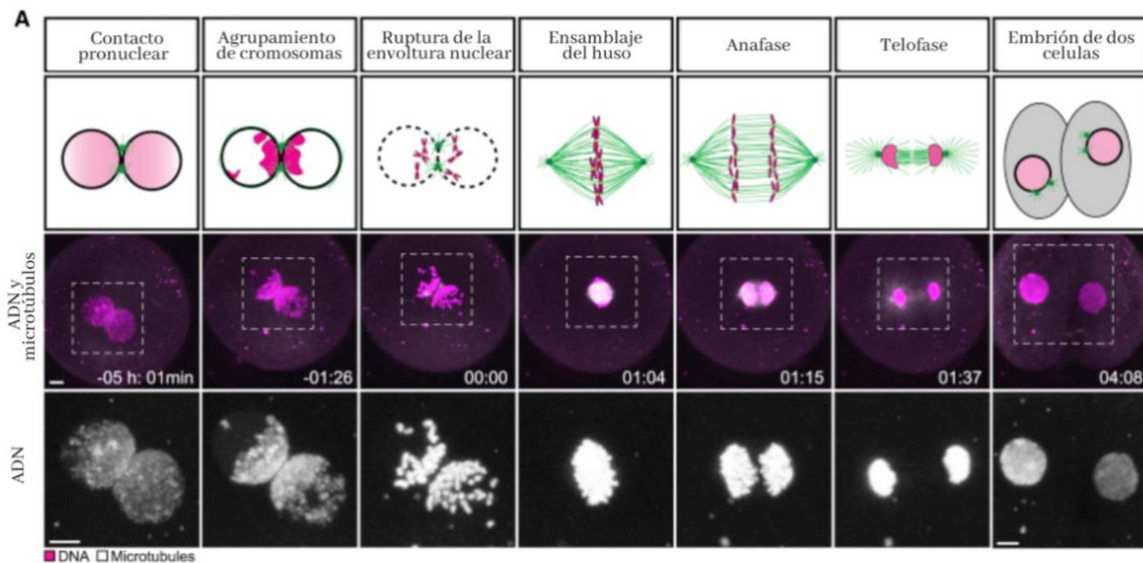


Figura 1. Organización de la cromatina y ensamblaje del huso en cigotos bovinos hasta embrión de dos células (Cavazza *et al.*, 2021).

El tiempo hasta la primera escisión varía entre 22 y 30 horas después de la fecundación en humanos; y entre 22 y 48 horas en bovinos, teniendo más embriones de dos células a 36 horas después de inseminación (hpi). Generalmente, los embriones de mejor calidad surgen de cigotos que se dividen por primera vez a las 30 horas y el potencial de desarrollo disminuye a medida que aumenta el tiempo desde la inseminación hasta la primera escisión. Los embriones derivados de cigotos que se dividieron muy tarde (> 42 hpi) generalmente no alcanzan la etapa de blastocisto (Lechniak *et al.*, 2008), como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Momento de la primera división de embriones *in vitro* en vacunos (modificado de Lechniak *et al.*, 2008).

Investigaciones	Cigotos con primera division <30 hpi			Cigotos con primera division >48 hpi		
	n	% clivaje	% blastocistos	n	% clivaje	% blastocistos
(Lonergan <i>et al.</i> , 1999)	550	76.8%	53.3%	166	23.2%	21.1%
(Dinnyés <i>et al.</i> , 1999)	1092	76.4%	41.0%	338	23.6%	16.6%
(Ward <i>et al.</i> , 2001)	952	30.1%	45.5%	1354	42.8%	20.0%
(Vandaele <i>et al.</i> , 2006)	278	32.0%	40.3%	222	35.4%	24.8%

2.1.2 Activación del genoma embrionario

La transición materno-embrionaria involucra los siguientes eventos: agotamiento de las transcripciones maternas por degradación y traducción; sustitución de transcritos maternos almacenados en ovocitos por transcritos embrionarios y la generación de nuevas transcripciones específicas de embriones (Graf *et al.*, 2014).

El encargado de controlar las primeras divisiones embrionarias son los factores maternos del citoplasma aportado durante el desarrollo folicular, mientras que el genoma del cigoto inicia la expresión de genes de manera gradual. Asimismo, durante la primera división embrionaria ocurre la degradación de proteína y del ARNm materno y se inicia la activación del genoma embrionario (Schulz & Harrison, 2019; Tadros & Lipshitz, 2009). Esta transición es importante para el desarrollo del embrión, debido a que coordina la división celular y la activación del genoma embrionario, preparando al embrión para la diferenciación celular y el desarrollo posterior (Jukam *et al.*, 2017). De esta manera, la activación del genoma se produce de manera gradual y algunos genes se transcriben mucho antes del evento principal de la activación (Latham & Schultz, 2001).

Una regulación incorrecta del momento de la activación y de los tipos de genes expresados puede conducir a una detención del desarrollo (Latham & Schultz, 2001). La etapa de ocho a dieciséis células de los embriones bovinos es el periodo de mayor actividad genómica, pero detectaron la primera actividad transcripcional en cigoto (Graf *et al.*, 2014), como se muestra en la figura 2.

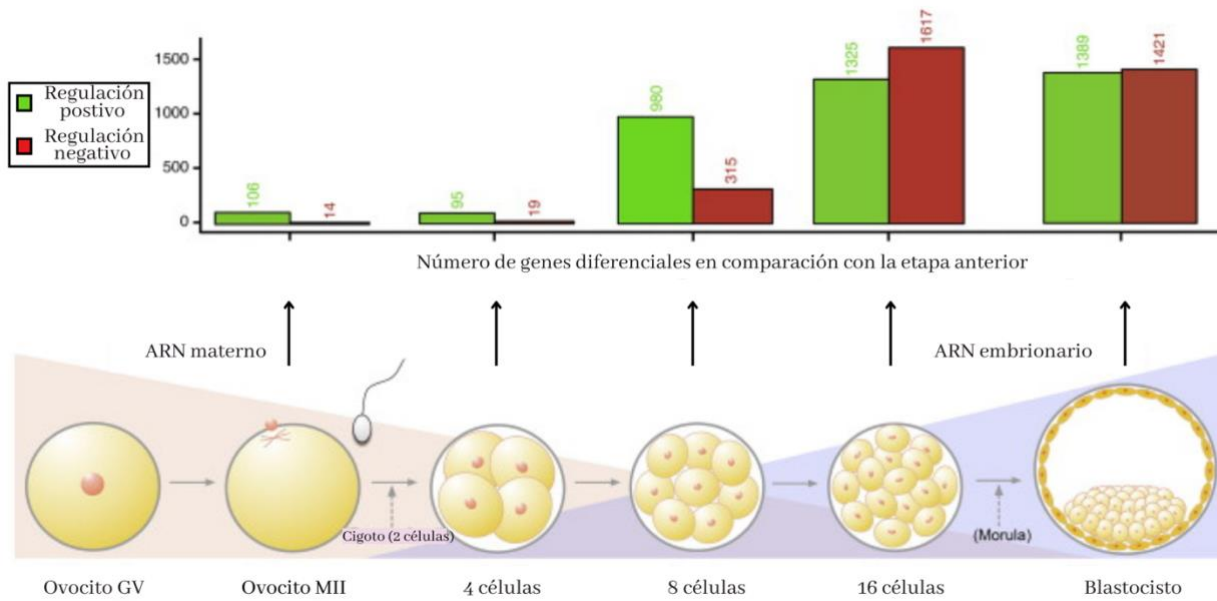


Figura 2. Diferenciales de expresión de genes desde cigoto hasta blastocisto (Graf *et al.*, 2014)

2.1.3 Primera diferenciación celular

En los embriones de mamíferos, el primer evento de diferenciación visible es la segregación de la masa celular interna y el trofoectodermo durante la transición de la mórula a la etapa de blastocisto (Sawai, 2021). Hay dos modelos diferentes con evidencia experimental sobre cómo se produce esta segregación temprana. El modelo "de adentro y fuera" argumenta que la posición que ocupan los blastómeros en la mórula determina el destino de la diferenciación, y las células internas se convierten en masa celular interna debido a su mayor número de contactos célula-célula (Srinivas & Rodriguez, 2017). Por otro lado, se sugiere que la base del trofoectodermo y los linajes de masa celular interna pueden ocurrir mediante un proceso de herencia diferencial, lo cual se explica en el modelo de "polaridad" (Johnson & Ziomek, 1981)

La diferenciación entre masa celular interna (ICM) y trofoectodermo (TE) en embriones tempranos es un proceso importante para la formación fetal y placentaria (Fujii *et al.*, 2010), esta diferenciación está regulada por la interacción entre varios factores transcripcionales como Octamer - 4 (OCT-4) y Caudal Type Homeobox 2 (CDX2), como se muestra en la figura 3, los cuales son esenciales para el desarrollo temprano y la expresión génica en embriones bovinos y porcinos (Sawai, 2021) (Figura 1). El trofoectodermo y la masa celular interna están comprometidos por la expresión de CDX2 y OCT-4, respectivamente, siendo el CDX2 necesario para el mantenimiento del trofoectodermo (Ozawa *et al.*, 2012)

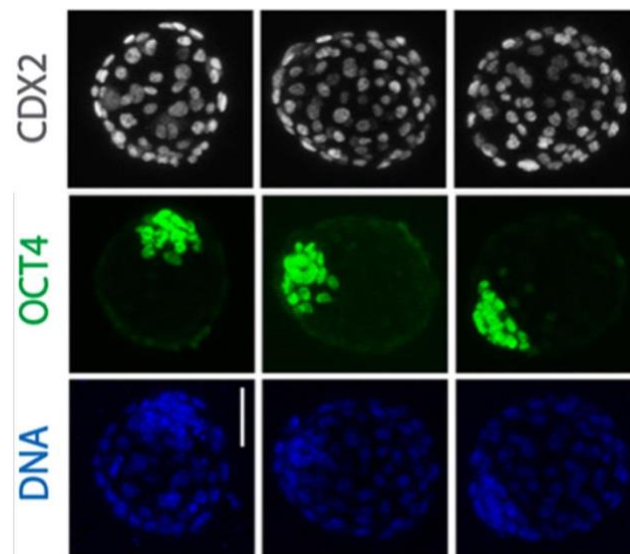


Figura 3. Blastocistos con expresión de OCT4, mientras que las células de trofoectodermo tiene expresión específica de CDX2 (Cui *et al.*, 2019).

2.1.4 Eclosión del blastocisto

La liberación del embrión de la zona pelúcida, en un proceso llamado eclosión, con la finalidad de establecer contactos celulares entre el trofoectodermo y el epitelio endometrio (Shafei *et al.*, 2017). Una combinación de lisinas producidas por la escisión del embrión y la expansión física reduce el grosor de la zona en preparación para la eclosión. La eclosión del blastocisto está relacionada con eventos preimplantacionales, aunque es un fenómeno de desarrollo distinto (Seshagiri *et al.*, 2016).

Se conoce tres mecanismos involucrados en el proceso de eclosión del blastocisto: debilitamiento de la zona pelúcida por degradación enzimática, fuerzas mecánicas ejercidas sobre la zona pelúcida por la expansión del blastocisto, y penetración de la zona pelúcida por proyecciones de células trofoectodermales (Negrón-Pérez & Hansen, 2017). En bovinos, la eclosión ocurre alrededor de 7 a 10 días después de la fecundación (Sugimura *et al.*, 2017) y existe casi la misma probabilidad de eclosión de los polos embrionario o abembrionario (opuesto a la masa celular interna) (Negrón-Pérez & Hansen, 2017), como se muestra en la figura 4.

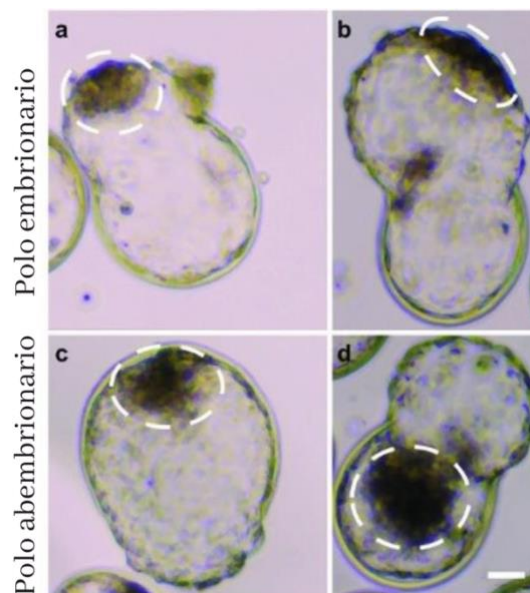


Figura 4. Eclosión de blastocitos de la zona pelúcida a través del polo embrionario (a, b) y el polo abembrionario (c, d). El área rodeada por la línea punteada representa la masa celular interna. (Negrón-Pérez & Hansen, 2017).

Alguna de las razones por lo cual no ocurre la ruptura de la zona pelúcida son: alteración en el cultivo *in vitro* causando endurecimiento de la zona; la ausencia de lisinas uterinas *in vitro*, la reducción de la producción de lisina del mismo embrión o el grosor de la zona pelúcida anormal (Schmoll *et al.*, 2003). Así también, existen técnicas para superar este problema, como es la mejora de las condiciones de cultivo *in vitro* o generando la eclosión asistida por modificación de la zona pelúcida (disección zonal parcial con herramientas mecánicas o láseres) (Vajta *et al.*, 1997).

2.1.5 Elongación del blastocisto

La elongación del concepto implica transiciones de un blastocisto esférico en el día 7, pasando por formas ovoides en el día 12 a 13, tubulares en el día 14 a 15 y finalmente filamentosas alrededor del día 16 a 17 (Spencer, 2013), como se muestra en la figura 5. El proceso depende de los componentes del fluido de la luz uterina, que son secretado posiblemente por el histótrofo bajo la influencia de progesterona. Aún no se ha establecido una concentración umbral del interferón requerida para establecer la preñez (Clemente *et al.*, 2011; Simintiras *et al.*, 2021). Estudios han determinado que el metabolismo general y la señalización de proteínas son característicos del inicio del alargamiento, mientras que las interacciones celulares, la señalización célula a célula y la adhesión celular se vuelven predominantes al final del alargamiento (Hue *et al.*, 2007).

El alargamiento del embrión se asocia con la producción de cantidades cada vez mayores de interferón tau y prostaglandinas en bovinos (Spencer, 2013). El proceso depende de los componentes del fluido de la luz uterina, secretado posiblemente por el histótrofo bajo la influencia de progesterona (Simintiras *et al.*, 2021). El desarrollo apropiado del embrión en la fase de elongación es muy importante para la implantación y el mantenimiento de la preñez. La pérdida gestacional puede ser alta durante el proceso de elongación inicial del blastocisto, lo que indica que es un período de desarrollo crucial (Blomberg *et al.*, 2008). Asimismo, este proceso de elongación es esencial desde el punto de vista reproductivo, debido a que la concentración de la señal del interferón tau derivada del embrión es necesaria para desencadenar la cascada de reconocimiento del materno (Simintiras *et al.*, 2021).

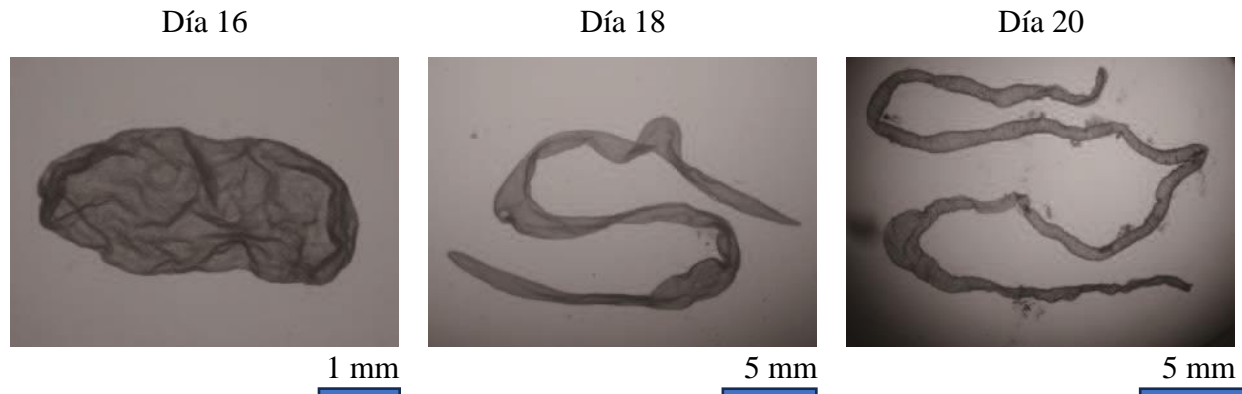


Figura 5. Embriones fecundados *in vivo* en etapa de elongación. Se muestran embriones representativos en los días 16, 18 y 20 (Hirayama *et al.*, 2014).

2.1.6 Reconocimiento materno – embrionario

El reconocimiento materno de la preñez se puede definir como el proceso fisiológico mediante el cual el embrión señala su presencia en el sistema materno y prolonga la presencia del cuerpo lúteo (Kowalczyk *et al.*, 2021). El 40% de pérdidas embrionarias ocurren entre los días 8 y 17 de gestación en vacas, generalmente esta pérdida se debe al fracaso entre la comunicación del feto y la madre (Wolf *et al.*, 2003) es por eso que se tiene que prevenir los mecanismos que provocan la luteólisis, manteniendo las concentraciones de progesterona que facilitan la implantación y el desarrollo fetal en el endometrio (Sánchez *et al.*, 2018),

El reconocimiento y la implantación del embrión actúa junto con la elongación del embrión (Bazer, 2011). Los factores embrionarios que afectan la implantación son las características propias del embrión, como su constitución genética, morfología y eclosión (Hartshorne & Edwards, 1991). En rumiantes, el interferón tau es secretado por células del trofoblasto de blastocistos y es una señal importante en el reconocimiento de preñez, teniendo la capacidad de modular la respuesta inmunológica materna para evitar el rechazo del embrión y, esta secreción del interferón Tau alcanza su límite máximo entre los días 15 y 17 (Wolf *et al.*, 2003), siendo alrededor del día 20 de gestación las primeras uniones entre el trofocodermo y el endometrio (Negrón-Pérez & Hansen,

2017). El interferón tau también induce la expresión de genes del endometrio y proteínas necesarios para la inmunomodulación, la remodelación de la matriz extracelular y las moléculas específicas de implantación. Estudios recientes han sugerido que los embriones bovinos alrededor del período de preimplantación inducen la expresión génica endometrial en la región caruncular necesaria para establecer la gestación (Adhikari *et al.*, 2022), como se muestra en la figura 6.

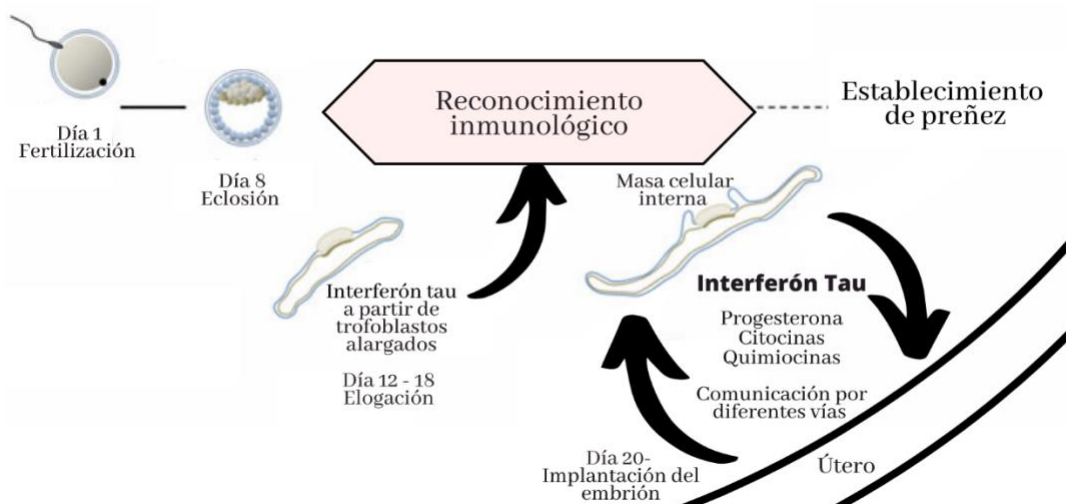


Figura 6. Participación del interferón Tau en la activación y reclutamiento de células inmunitarias para una buena comunicación embrio-materna y el reconocimiento de la preñez (Bai *et al.*, 2012).

2.2 Métodos en la selección de embriones

El mayor potencial de implantación se origina al identificar el mejor embrión, generando la reducción del número de embriones transferidos. Existe varios métodos para seleccionar al embrión como es la evaluación de la morfología convencional, morfocinética, pruebas genéticas preimplantacionales de secreciones en medio de cultivo (proteómicas, metabolómicas, consumo de oxígeno y medición del estrés oxidativo) (Anagnostopoulou *et al.*, 2022).

2.2.1 Morfología

La evaluación de la calidad del embrión es fundamental a la hora de seleccionar los mejores embriones para transferir o criopreservar (Nel-Themaat & Nagy, 2011). La evaluación de la morfología embrionaria es actualmente el método más popular para la selección de embriones antes de la transferencia en bovinos (Van Soom *et al.*, 2003). El único instrumento utilizado para la evaluación embrionaria es el microscopio de luz invertida, que proporcionaba información basada en características morfológicas (Nel-Themaat & Nagy, 2011). A pesar de que la morfología se utiliza a nivel mundial, no es un indicador confiable debido a la subjetividad y su incapacidad para detectar anomalías genéticas (Fadon *et al.*, 2021).

La decisión sobre si un embrión pueda ser utilizado para transferencia y congelación se basará en la destreza y la experiencia de la persona que evalúa los embriones (Bo & Mapletoft, 2013). Las características morfológicas como el color de los blastómeros, el grado de compactación, el momento de la formación y expansión del blastocisto pueden vincularse con la calidad del embrión (Van Soom *et al.*, 2003). Según la IETS, los sistemas de codificación estandarizados para la descripción de embriones es la etapa de desarrollo y la calidad del embrión, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Criterios morfológicos para clasificar embriones bovinos (Modificado de Stringfellow & Givens, 2010)

Etapa de desarrollo		Calidad del embrión	
Código	Estado	Código	Clasificación
1	No fecundado	1	Excelente o bueno
2	2 a 12 células	2	Regular
3	Mórula temprana	3	Pobre
4	Mórula	4	Muerto o degenerado
5	Blastocisto temprano		
6	Blastocisto		
7	Blastocisto expandido		
8	Blastocisto eclosionado		
9	Blastocisto expandido eclosionado		

La tasa de preñez observadas después de la transferencia embrionaria (TE) (código 1 o 2) a receptores adecuados varían entre el 30 y el 60 % (Erdem *et al.*, 2020a; Hasler *et al.*, 1995; Yao *et al.*, 2018), donde los embriones de calidad de código 1 eran más altas en comparación con los embriones de Código 2 (Erdem *et al.*, 2020b), como se muestra en la tabla 3 y 4. El promedio de tasa de preñez usando semen sexado es del 30 %. Sin embargo, la pérdida de preñez entre aproximadamente el día 32 y el término fueron del 16 % usando semen convencional y el 37 % con semen sexado. Además, las pérdidas de preñez a términos son mayores para las vacas que recibieron embriones producidos *in vitro* que las vacas inseminadas artificialmente (Rasmussen *et al.*, 2013).

Tabla 3. Tasa de preñez despues de la TE *in vivo* e *in vitro* de embriones de calidad 1, 2 y 3 (Hasler *et al.*, 1995)

Embrión	Día de transferencia	Porcentaje de preñez		
		Grado 1	Grado 2	Grado 3
<i>In vitro</i> – fresco	7	59	45	-
<i>In vitro</i> – fresco	8	48	30	-
<i>In vitro</i> – fresco	9	41	-	-
<i>In vivo</i> – fresco	7	76	66	54

Tabla 4. Tasa de preñez y calidad de embriones transferidos en el día 7 y 8 (Hasler *et al.*, 1995)

Estadio embrionario	Porcentaje de preñez			
	Día 7		Día 8	
	Grado 1	Grado 2	Grado 1	Grado 2
Mórula	56	43	-	-
Blastocisto temprano	56	41	33	27
Blastocisto	58	46	46	31
Blastocisto expandido	62	56	51	33
Blastocisto expandido	50	-	56	-

2.2.2 Morfocinética

La combinación de la apariencia del embrión (morfología) y la importancia de cuándo y cómo se producen los procesos celulares que conducen a esta apariencia (cinética) ahora se integran en el concepto único denominado morfocinética (Herrero & Meseguer, 2013). La disponibilidad comercial de diferentes dispositivos de monitoreo del desarrollo (time lapse system) para embriones facilita el uso de la morfocinética como herramienta adicional en la selección de

embriones (Findikli & Oral, 2014). Este tipo de sistema permite la medición de parámetros que se rige como guía para ayudar a los embriólogos en la selección del mejor embrión para transferencia (Rocha *et al.*, 2016). El monitoreo usando el equipo time lapse es un método eficaz para la obtención de imágenes continuas del desarrollo de cada embrión individual *in vitro*, lo que permite la predicción del crecimiento y el potencial de desarrollo del embrión bovino a través de parámetros morfocinéticos como el momento de la escisión, la dinámica morfológica, la velocidad de desarrollo, la simetría de la división celular y el alcance de la fragmentación citoplasmática (Sugimura *et al.*, 2017).

La cinética de los embriones bovinos producidos *in vitro* está relacionada con la viabilidad embrionaria, el metabolismo y los patrones epigenéticos (Silva *et al.*, 2016). En términos generales, se considera ampliamente aceptado que los embriones que experimentan una división temprana tienen una mayor probabilidad de convertirse en blastocistos. Además, se ha observado que el momento de eventos posteriores, como la formación y expansión de blastocistos, puede predecir el potencial de implantación y el estado euploide del embrión. (Lewis *et al.*, 2019). Los parámetros cuantitativos y cualitativos que pueden estar asociados con la formación exitosa de blastocistos y la preñez, la cual se muestran en la figura 7 (Magata, 2023).

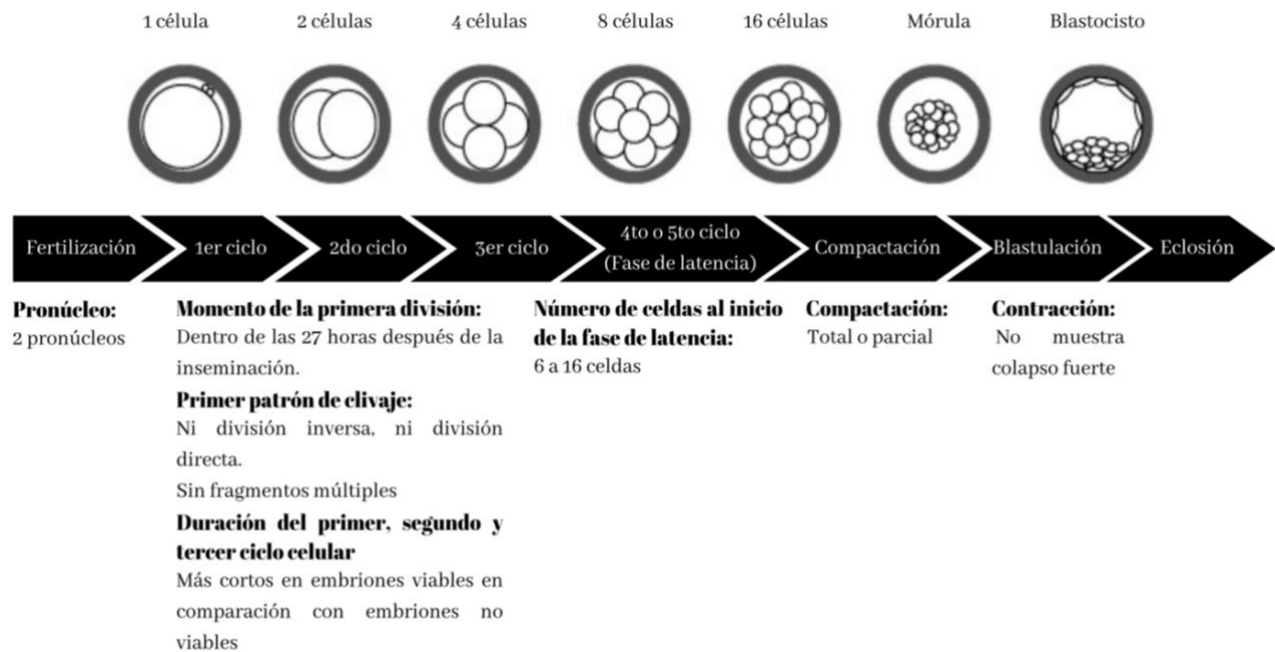


Figura 7. Parámetros cuantitativos y cualitativos generados por monitoreo de time lapse, que pueden estar asociados a la formación exitosa de blastocisto bovino y preñez (Magata, 2023).

En un estudio, se utilizó el sistema de time lapse para identificar de forma no invasiva los parámetros que reflejan la viabilidad después de la transferencia. Se evaluó: momento de la primera división y el número de blastómeros al final de la primera escisión. Mediante esta evaluación la tasa de preñez mejoró en un 31% con respecto al uso de la evaluación morfológica convencional (Sugimura *et al.*, 2017), como se muestra en la figura 8.

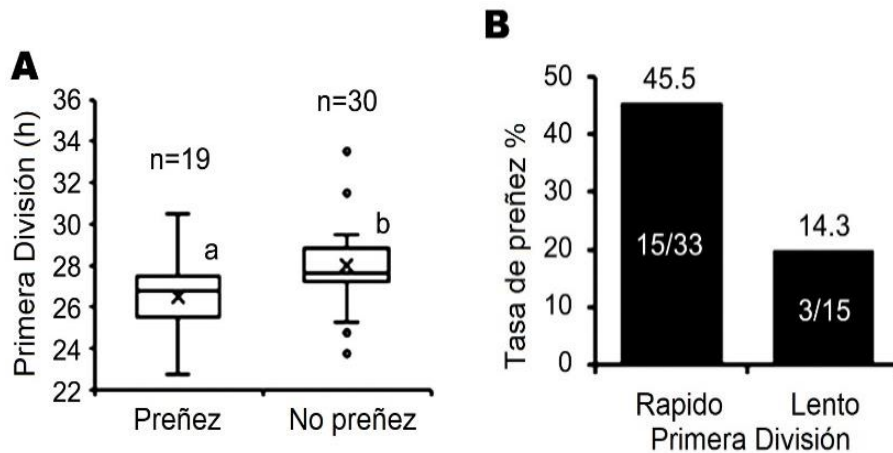


Figura 8. La relación entre (A) el momento de la primera división en los embriones que resultan en preñeces exitosas o fallidas después de la transferencia, (B) el porcentaje de vacas preñadas después de la TE con diferentes momentos para la primera escisión (Modificado de Sugimura *et al.*, 2017).

En la actualidad existen diferentes empresas que producen equipos para morfocinética embrionaria como: Primo Vision, Vitrolife, Esco Medical, Genea Biomedx (ver Figura 9). El precio de un dispositivo de time lapse es relativamente alto, cada sistema posee un tipo de plato de cultivo compatible con la cámara de la incubadora, y el precio de esos platos puede ser más alto que la variedad de platos de cultivo de IVF disponibles en el mercado (Sciorio & Meseguer, 2021).






<i>Marca</i>	<i>Equipo</i>	<i>Marca</i>	<i>Equipo</i>
<i>Primo Vision</i>		<i>Genea Biomedx</i>	
<i>Vitrolife</i>		<i>Esco Medical</i>	
<i>Eeva</i>			

Figura 9. Equipos de time lapse comerciales que registran datos e imágenes continuas de la morfocinética del embrión, cada equipo posee diferente capacidad de embriones.

Dirvanauskas *et al.*, (2019) calculó un algoritmo para seleccionar imágenes generadas de incubadoras automáticas de time lapse que consta de dos partes: la parte de extracción de características, basado en una combinación de red neuronal convolucional y la parte de clasificación, basado en discriminantes mediante votación; ha logrado una precisión de predicción de casi el 100 % en la clasificación de embriones de una o dos células.

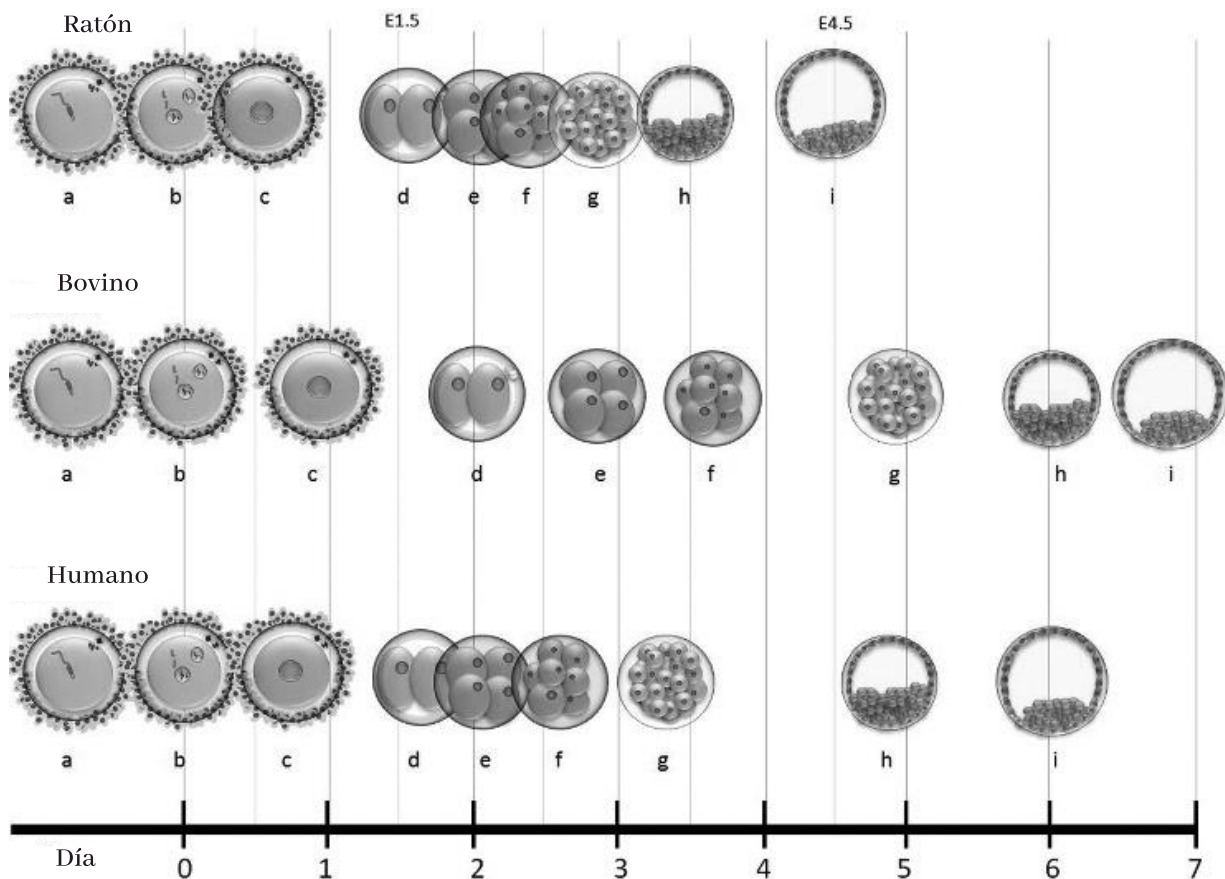


Figura 10. Comparación entre el desarrollo embrionario temprano de ratón, bovinos y humanos. (a) Fecundación; (b) formación pronuclear; (c) cigoto; (d) embrión de 2 células; (e) embrión de 4 células; (f) embrión de 8 células; (g) Mórula; (h) blastocisto temprano; (i) blastocisto (Rodríguez-Osorio *et al.*, 2012)

En un estudio en humanos, los embriones seleccionados usando el sistema de time lapse tenían una tasa de implantación relativa de un 20,1% más alta que los embriones seleccionados tradicionalmente mediante observación, sin embargo en otras investigaciones en 10 clínicas varía de -5% a +50% , esto se puede deber a inconsistencias en la forma en que se midieron o los parámetros que se utilizaron para la selección. Además, al uso de la incubadora para la IVP

tradicional y el uso de time lapse (Kaser & Racowsky, 2014). La tabla 5 muestra resultados de tiempo de división embrionaria monitoreada por time lapse.

Tabla 5. Tiempo promedio de aparición de diferentes estados de desarrollo en bovinos observado por monitoreo del desarrollo (Benne *et al.*, 2021)

Estado de desarrollo	Tiempo promedio de primera aparición
2 células	30,1 ± 4,8 h
3 a 4 células	40,0 ± 5,5 h
5 a 8 células	50,5 ± 10,5 h
Blastocisto	153,9 ± 14,1 h
Blastocisto expandido	165,9 ± 12,5 h
Blastocisto eclosionado	175,0 ± 9,1 h

2.2.3 Marcadores moleculares

Un marcador molecular se define como cualquier secuencia de ADN, ARN o proteína que puede ser detectado utilizando una técnica molecular (Saraswathy & Ramalingam, 2011). Los marcadores moleculares de ovocitos y embriones son diferentes ARN mensajero, proteínas y aminoácidos, lo cuales han sido fundamentales para seleccionar los mejores ovocitos y embriones para las tecnologías reproductivas. Estas técnicas en algunos casos implican la destrucción del ovocito o embrión, impidiendo el uso práctico de biomarcadores en sistemas de producción y TE *in vitro* (Orozco-Lucero & Sirard, 2014). En la tabla 6, se muestra marcadores moleculares en diferentes estados de desarrollo de embriones bovinos.

Tabla 6. Marcadores moleculares en diferentes estados de desarrollo embrionario (Orozco-Lucero & Sirard, 2014)

Factor	Tipo	Estado de desarrollo	Referencia
NASP, AURKA, IQGAP, SMARCA5, DDX10, DNMT1, RGS2	mRNA	Cigoto	Dessie <i>et al.</i> (2007)
Aminoácidos totales	Aminoácidos	Cigoto	Sturmey <i>et al.</i> (2010)
TCP1, RAD50, YEAF1 (RYBP), CTSB, IDH	mRNA	2 células	Dode <i>et al.</i> (2006)
CX43, IGF2, IGF1R, IFNT, GLUT5, SOD2	mRNA	2 células	Gutierrez-Adan <i>et al.</i> (2004)
PI3KCA, ITM2B	mRNA	8 células	Ripamonte <i>et al.</i> (2012)
CTNNB1	Proteína	Mórula	Modina <i>et al.</i> (2007)
MSMO1, ABCC2, OCT4, PGRMC1, NFE2L2, CYP51A, SFN, HMOX1, PTGS2, PRDX1	mRNA	Blastocisto	Gad <i>et al.</i> (2012)
PLAC8, HMGCS1, LDHB, RPS4X, PLAU, NTR	mRNA	Blastocisto	Côté <i>et al.</i> (2011)

En los últimos años, estudios sugieren biomarcadores no invasivos como el nivel de apoptosis en células de cúmulo (Aguila *et al.*, 2020) y la expresión de GPC4 que se puede utilizar como marcador para distinguir el complejo cúmulo ovocito (COC) con potencial de desarrollo embrionario de aquellos con potencial de desarrollo limitado (Kussano *et al.*, 2016). Otra investigación sugiere el perfil de aminoácido debido a que el metabolismo de los aminoácidos puede predecir la capacidad de los cigotos bovinos para desarrollarse hasta la etapa de blastocisto (Sturmey *et al.*, 2010). Los microRNA secretados por embriones se pueden utilizar como posibles biomarcadores no invasivos para seleccionar los mejores embriones para transferencia (Esmailvand *et al.*, 2022).

Se ha usado la tinción con azul de cresilo brillante (colorante) que determina la actividad intracelular de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Esta enzima es sintetizada durante la fase de crecimiento del ovocito, pero con actividad disminuida en los ovocitos que han terminado su fase de crecimiento, los ovocitos seleccionados con esta técnica fueron más grandes y más competentes para producción de embriones sin embargo los que llegaron al estado de blastocistos fueron menores en comparación con el grupo control (Pujol *et al.*, 2004). Otros estudios han demostrado el papel crítico del ácido oleico para contrarrestar los efectos perjudiciales de los ácidos grasos saturados y en el apoyo paracrino del desarrollo de los ovocitos. La mayoría de los datos sugieren que el ácido oleico puede contribuir al desarrollo normal de los ovocitos y embriones preimplantacionales a través de mecanismos que implican la partición metabólica de los ácidos grasos, el cambio en la organización estructural de la membrana, la atenuación del estrés oxidativo y la regulación de la señalización intracelular (Fayezi *et al.*, 2018)

2.3 Métodos de recuperación de ovocitos

Las técnicas reproductivas son métodos prácticos y factibles que se han utilizado intensamente para mejorar el rendimiento reproductivo y acelerar la ganancia genética en el ganado lechero (Da Silva *et al.*, 2017). Los ovocitos para producción de embriones se pueden obtener mediante:

2.3.1 Ovocitos de vacas en matadero

En el 2021, el número de embriones a partir de ovocitos derivados de matadero representa 1,4% del total de embriones producidos por IVP. El uso de ovocitos de matadero se vio incrementado en Europa (+56,2 %) y América del Norte (+97,1 %), pero disminuyó en América del Sur (-29,0 %), lo que resultó en una disminución general del 7,5 % (21.882 en 2021 frente a 23.649 en 2020). Además, el número de transferencias de embriones generados de ovocitos de matadero en 2021 disminuyó en comparación con el 2020 (7,495 frente a 7,926 respectivamente), viéndose reflejada en la disminución en América del Sur (-19,8 %) y en el aumento en Europa (+136,1 %) (IETS, 2021).

La IVP utilizando ovocitos recuperados de ovarios de matadero es importante en la investigación ya que se podría mejorar las tecnologías de producción de embriones y comprender los mecanismos básicos que controlan la embriogénesis temprana (Ashry & Smith, 2015). Una de las ventajas de usar ovarios de matadero es que este procedimiento puede producir una gran cantidad de embriones debido a la cantidad de COCs intactos (Ashry & Smith, 2015) y no expandidos a partir de folículos de 2 a 8 mm de diámetro. Además, requiere menos número de lavado que podría originar la denudación del COCs (Sayid, 2021).

En la aspiración folicular, el tamaño de la aguja y la presión de vacío influyen en la recuperación exitosa de ovocitos de folículos. En bovino, se han aspirado folículos con agujas de 18 a 22 g y jeringas de 3 a 20 ml, Fry *et al.* (1997) encontró más ovocitos aspirando con la aguja de 17 g que con una aguja de 20 g, como se muestra en la tabla 7. Además, Sasamoto *et al.* (2003) informó que las presiones de vacío óptima con respecto a la tasa de recuperación de ovocitos y a la fijación de las células de cúmulo, fueron de 75 mmHg (7,5 ml/min) y 50 mmHg (8,0 ml/min). Una presión de vacío por encima de 75 mmHg no aumentará la tasa de recuperación de ovocitos y originará el desprendimiento de las células de cúmulo, como se muestra en la tabla 8 (Sasamoto *et al.*, 2003).

Tabla 7. Influencia del tamaño de aguja en la aspiración de ovarios de matadero (Fry *et al.*, 1997)

Tamaño de aguja	Número de folículos aspirados	Número de ovocitos recuperados	Tasa de recuperación	Calidad de ovocitos (%)					Tasa de viabilidad
				A	B	C	D	E	
17G	228	108	47	11	18	14	4	1	42
20G	117	40	34	11	9	11	3	1	31

Tabla 8. Efectos de la presión de vacío en la recuperación de ovocitos de ovarios del matadero (Sasamoto *et al.*, 2003).

Presión de vacío (mmHg)	Velocidad de aspiración (ml/min)	N° de folículos aspirados (repeticiones)	% Ovocitos recuperados	% Calidad de ovocitos			
				I	II	III	IV
50	5.0	80 (4)	50.0 ± 4.1	75.2 ± 12.8	7.3 ± 9.5	7.6 ± 5.1	10.0 ± 14.1
75	7.5	105 (5)	66.2 ± 16.1	68.9 ± 3.9	14.7 ± 9.1	7.0 ± 6.7	9.4 ± 6.5
100	10.5	105 (5)	71.0 ± 6.5	65.5 ± 9.9	16.8 ± 7.3	13.4 ± 6.6	4.4 ± 6.5
125	13.0	105 (5)	75.4 ± 8.4	49.4 ± 11.6	18.5 ± 7.8	24.5 ± 12.6	7.6 ± 5.5
150	15.5	105 (5)	72.8 ± 10.6	35.1 ± 3.6	5.0 ± 2.8	50.4 ± 4.7	8.9 ± 4.0

2.3.2 OPU- Ultrasonografía

La aspiración de ovocitos guiados por ultrasonografía transvaginal (OPU-U) permite la recuperación repetida de ovocitos de hembras genéticamente superiores (Manjunatha *et al.*, 2008). La OPU-U se ha utilizado ampliamente en varios programas que utilizan la producción de

embriones *in vitro* (Fry *et al.*, 1997). En los EE. UU., la combinación de tecnología OPU-IVP se adoptó a nivel comercial a fines de la década de 1990. Para entonces, se usaba principalmente para producir embriones de hembras "problemáticas" que, por diferentes razones, no podían generar embriones viables naturalmente (Ferré *et al.*, 2020a).

La OPU ofrece la posibilidad de aumentar significativamente tanto el número de embriones transferibles como el número de preñeces por vaca al año. Es posible realizar hasta dos sesiones de aspiración folicular por semana y obtener un promedio de 4,1 ovocitos por vaca en cada sesión. Sin embargo, si se trata hormonalmente a las donantes, este número puede aumentar a 10,4 ovocitos por vaca en cada sesión. (Morera-Jiménez *et al.*, 2022).

El uso de tratamientos de superestimulación con FSH y gonadotropinas permite la recuperación de ovocitos con mayor viabilidad y competencia para la fecundación y el posterior desarrollo en embriones de calidad óptima para transferencia (Kim & Yi, 2023; Ongaratto *et al.*, 2020), como se muestra en la tabla 9. Esto se logra porque los tratamientos con FSH conducen al desarrollo de una mayor proporción de folículos de tamaño mediano en comparación con la de folículos de donantes no tratados con FSH para la superestimulación folicular (Ongaratto *et al.*, 2020). Se ha demostrado en el ganado que, durante el crecimiento de los ovocitos, el ARNm y las proteínas se almacenan en el ovocito, y la composición del ARN es esencial para mantener los primeros ciclos celulares del desarrollo temprano del embrión (Vieira *et al.*, 2014).

Es importante tener en cuenta que el número de ovocitos obtenidos a través de la OPU puede variar debido a factores como la raza de la vaca, su condición corporal, su edad, el uso de estimulación hormonal, la presión de aspiración, el momento del ciclo estral en el que se realiza la aspiración y el diámetro de la aguja de aspiración, entre otros (Morera-Jiménez *et al.*, 2022).

Tabla 9. Comparación de la capacidad de desarrollo de los cigotos y la tasa de preñez de embriones transferidos en vacas *bos taurus* superestimuladas con FSH y control (Kim & Yi, 2023).

Grupo	Nº ovocitos madurados (repeticiones)	Clivaje n (%)	Etapa de 8 células n (%)	Blastocistos n (%)	Nº de embriones transferidos	Tasa de preñez %
Control	884 (120)	621 (70.2)	464 (52.4)	275 (31.1)	412	45.1
FSH	1116 (90)	917 (82.2)	828 (74.2)	499 (44.7)	155	60.6

2.3.3 OPU-Laparoscopia

La OPU-Laparoscopia (OPU-L) se usó inicialmente para la recuperación de ovocitos de hembras valiosas de especies donde era muy difícil o imposible por OPU-U, debido a problemas de tamaño animal (Baldassarre & Bordignon, 2018). La IVP a partir de OPU-L tiene el potencial de producir más descendientes de hembras genéticamente superiores (Baldassarre, 2021).

En vacas adultas, la laparoscopia se puede utilizar ampliamente para el diagnóstico y tratamiento de diversos trastornos reproductivos, siendo mínimamente invasivo y teniendo bajo riesgo de complicación. Sin embargo, es un procedimiento que requiere tiempo e instrumentación especializados (Sofi & Singh, 2018). Actualmente, la técnica OPU-L está siendo utilizada en animales pequeños. Baldassarre (2021) realiza la OPU-L en terneras bovinos y búfalos de 2 a 6 meses de edad combinada con IVP obteniendo en terneras una tasa de escisión del 60-70 % y tasas de blastocistos de alrededor del 20 % (Baldassarre, 2021).

A diferencia de la ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET), OPU-L presenta las ventajas de ser menos invasivo y causar menos estrés postoperatorio, y puede repetirse en un intervalo más corto (mínimo de 60 días para MOET frente a un mínimo de 14 días para LOPU), además de no causar adherencias ni fibrosis y las adherencias que ocurren comúnmente después de múltiples MOET. Además, LOPU-IVP producirá un promedio de 4 a 5 blastocistos para la

transferencia (Jorge Neto *et al.*, 2018). En la tabla 10 se muestra el promedio de COCs aspirados en diferentes especies.

Tabla 10. Promedio de COCs aspirados por OPU- Laparoscopia en diferentes especies (Jorge Neto *et al.*, 2018).

Especie	Categoría	Nº sesiones	Foliculos aspirados	COCs recuperados	Tasa de recuperación
Cabra	Adulto	21	399	334	83.7 %
	Adulto	18	221	146	66.1 %
	2-3 meses	20	1186	994	83.8 %
	3-5 meses	36	1238	987	79.7 %
	3-5 meses	23	897	653	72.8 %
Oveja	Adulto	142	1941	1522	78.4 %
Vaca	2-6 meses	63	1953	1351	69.2 %
	2-6 meses	24	N/A	111	
	2-4 meses	20	1025	853	83.2 %
Búfalo	2-6 meses	47	903	774	85.7 %

2.4 Producción de embriones

La producción de embriones es una tecnología ampliamente utilizada para mejorar genéticamente la reproducción. En la actualidad, hay dos sistemas para producir embriones: la producción de embriones *in vivo* a través de la multiovulación y transferencia de embriones (MOET), y la producción de embriones *in vitro* (IVP). Ambas técnicas permiten que las hembras donantes de alta calidad genética produzcan una gran cantidad de descendientes en un corto período de tiempo (Díez Monforte *et al.*, 2013).

2.4.1 Producción de embriones *in vivo*

La ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET) es una importante herramienta en la industria para incrementar el número de individuos superiores genéticamente (Gomes *et al.*, 2019). En el 2021, se colectaron un total de 386.374 embriones *in vivo* transferibles, un 6,8% más que en 2020 (361.728). En todos los continentes, la cantidad de embriones *in vivo* recuperados en 2021 aumentó en Europa (+6,2 %), América del Norte (+9,7 %) y Oceanía (+218,5 %), pero disminuyó en América del Sur (-27,7 %) en comparación con 2020. A pesar del aumento en números absolutos, los embriones bovinos *in vivo* representan solo el 20,3% del total de embriones registrados y el 21,2% de los embriones transferidos en todo el mundo, en ambos casos una ligera reducción en comparación con 2020 (fue del 23,8% y 25,1%, respectivamente) (IETS, 2021), como se muestra en la figura 11.

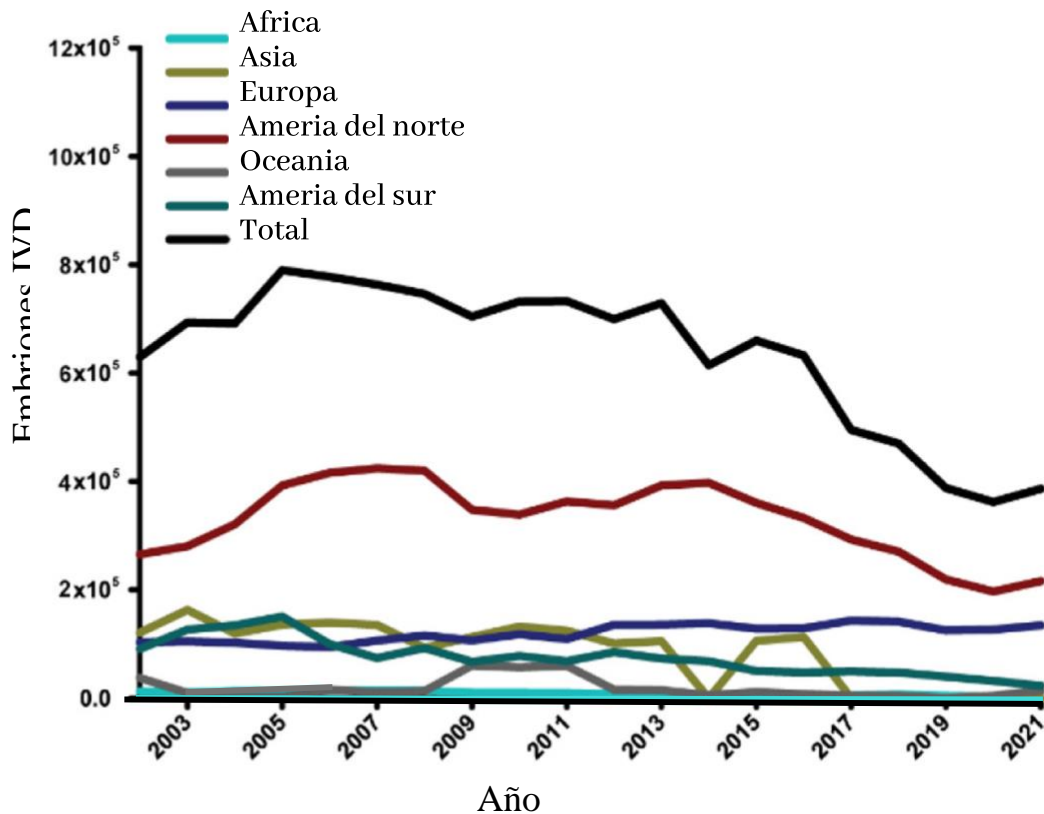


Figura 11. Número de embriones colectados en vacas en el periodo del 2002 al 2021 en los diferentes continentes (IETS, 2021)

La respuesta ovárica después del tratamiento de superestimulación es muy variable: un tercio de las donantes tratadas no responde a la superovulación, otro tercio produce un promedio de uno a tres embriones y solo un tercio realmente superovula dando una gran cantidad de embriones. Siendo el promedio de recuperación de cuatro a seis embriones con una óptima calidad para transferir (Machaty *et al.*, 2012). La recuperación de embriones se realiza el día 7 después de la inseminación artificial, se espera que se recuperen en estadio de mórula y blastocistos (Pinto, 2022). La tasa de preñez es diferentes entre los embriones *in vivo* e *in vitro* en el día 30 y 60 después de la TE, como se muestra en la tabla 11 (Pontes *et al.*, 2009).

Tabla 11. Comparación de tasa de preñez con embriones producidos *in vitro* e *in vivo* (Pontes *et al.*, 2009).

Técnica de Producción	Embriones Transferidos	Vacas preñadas al día 30 después TE n (%)	Vacas preñadas al día 60 después TE n (%)	Perdida embrionaria n (%)
<i>In vitro</i>	910	341 (37.4%)	305 (33.52%)	36 (10.5%)
<i>In vivo</i>	289	132 (45.6%)	120 (41.52%)	12 (9.0%)

La eficiencia de la producción de embriones es un factor importante. En la ganadería lechera existe un gran interés en utilizar semen sexado para obtener más vaquillas para reemplazo o venta. Un estudio informa que la tasa de embriones transferibles numéricamente fue menor y la tasa de óvulos no fecundado fue mayor en el grupo de espermatozoides sexados en comparación con las vaquillas inseminadas con la misma cantidad de espermatozoides no sexados del mismo toro (Hayakawa *et al.*, 2009), como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Producción de embriones *in vivo* con donadoras inseminadas con semen sexado y convencional (Hayakawa *et al.*, 2009)

Tipo de semen	N° lavados	N° de ovas	% ovas		
			Transferibles	Degenerado	No fecundado
Sexado	5	12.6 ± 4.3	53.4 ± 11.6	24.8 ± 5.8	21.8 ± 11.0
Convencional	5	20.2 ± 4.2	68.1 ± 9.7	26.6 ± 9.6	5.3 ± 2.5

2.5 Producción de embriones *in vitro*

La IVP de embriones en ganado vacuno han mostrado avances significativos en los últimos años (Ferré *et al.*, 2020b). En el 2021, observamos un aumento notable en el número de embriones *in vitro* (1.521.018 vs. 1.156.422 en 2020), lo que representa un aumento del 25,6% en el total mundial, el más alto desde 2003 (IETS, 2021).

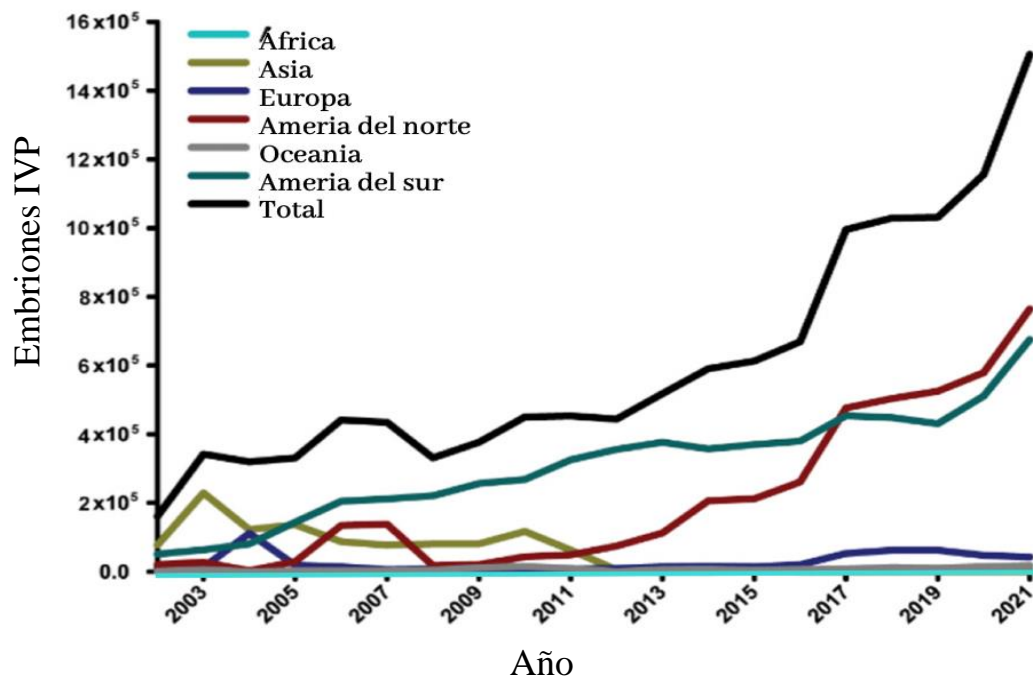


Figura 12. Número de embriones de ovocitos aspirados de vacas en el período de 2002 al 2021 en los diferentes continentes (IETS, 2021).

La creciente popularidad de la IVP se debe, en parte, a los beneficios que ofrece, como la aceleración de la mejora genética, la producción de embriones en animales jóvenes y la posibilidad de recolectar ovocitos con mayor frecuencia en comparación con la técnica de MOET (Brown *et al.*, 2024). Es por eso que, la IVP en bovinos están sustituyendo el MOET como el principal método para generar embriones transferibles de alta calidad genética. Sin embargo, existen limitaciones en el IVP relacionados a factores maternos, paternos, embrionarios y relacionados con el cultivo que puede afectar los embriones *in vitro* (Wooldridge *et al.*, 2022).

En *Bos indicus*, es posible obtener una gran cantidad de ovocitos a través de OPU sin la necesidad de superestimulación. Por el contrario, en *Bos taurus*, para lograr un alto número de COC por OPU es necesario sincronizar la aparición de la onda folicular y realizar la superovulación (Bó *et al.*, 2019). Alrededor de un 27% de los embriones IVP transferidos resultan en nacimientos vivos. Cerca del 73% de los casos de preñez fallida se deben, en parte, la TE de baja calidad. Esto ocurre como resultado de evaluaciones morfológicas incorrectas basada en evaluaciones visuales, que es el método utilizado actualmente para evaluar los embriones antes de la transferencia. (Rabel *et al.*, 2023)

La IVP incluye tres procesos: maduración de ovocitos, fecundación de ovocitos maduros y cultivo de ovocitos fecundados para obtener blastocistos (Gallego *et al.*, 2022). Después de 20-24 h de incubación, aproximadamente el 90% de los ovocitos cultivados *in vitro* experimentan una maduración nuclear y citoplasmática (Ramos-Ibeas *et al.*, 2020). Después de la maduración, los ovocitos se incuban con espermatozoides capacitados y seleccionados para llevar a cabo la fecundación *in vitro* (Ferré *et al.*, 2020a), del 90% que alcanzaron una maduración exitosa solo el 80% son fecundados. Los retrasos en la fecundación posiblemente podrían conducir al envejecimiento de los ovocitos o la formación de un embrión defectuoso (Ramos-Ibeas *et al.*, 2020). Después de 18 a 20 horas, se procede a colocar los posibles cigotos en el medio de cultivo (Tríbulo *et al.*, 2019), el cual debe de tener buenos componentes, como aminoácidos, antioxidantes, vitaminas, coenzimas para apoyar el desarrollo de embriones bovinos (Feugang *et al.*, 2009), los cuales actúan como factores nutricionales y reguladores de la homeostasis ambiental (Nömm *et al.*, 2019).

La utilización de semen sexado es una gran ventaja en la fecundación *in vitro* debido a que requiere una pequeña cantidad de espermatozoides para fecundar los ovocitos recuperados, lo que a primera vista favorece la utilización de semen sexado (Contreras *et al.*, 2015) cómo se puede apreciar en la tabla 11.

Tabla 13. Comparación de tasa de clivaje y blastocistos *in vitro* obtenidos de *Bos indicus* y *Bos taurus* fecundado con semen convencional y sexado (Contreras *et al.*, 2015)

Tipo de semen	<i>Bos indicus</i>				<i>Bos taurus</i>	
	COC	Clivaje (%)	Blastocistos (%)	Ovocitos Cultivados	Clivaje (%)	Blastocistos (%)
Convencional	3739	2182 (53%)	901 (21.9%)	798	461 (54.1%)	161 (18.9%)
Sexado	3166	1886 (59.1%)	731 (22.9%)	3557	2150 (56.4%)	595 (15.6%)

2.6 Factores que afectan la transferencia de embriones

Algunos factores que afectan la TE, como se muestra en la figura 13, son los siguiente: la etapa de desarrollo y la calidad del embrión, el lugar de depósito del embrión en el útero, el nivel de dificultad de la transferencia, el uso de embriones congelados o frescos, la experiencia del operador, el uso de una vaquilla o vaca y la temporada de transferencia (Erdem *et al.*, 2020, Ferraz *et al.*, 2016). Uno de los factores más conocidos que afectan la TE es la calidad embrionaria. Sin embargo, existen otros factores en el momento de la transferencia, que tienen relación con las receptoras (Hasler, 2004).

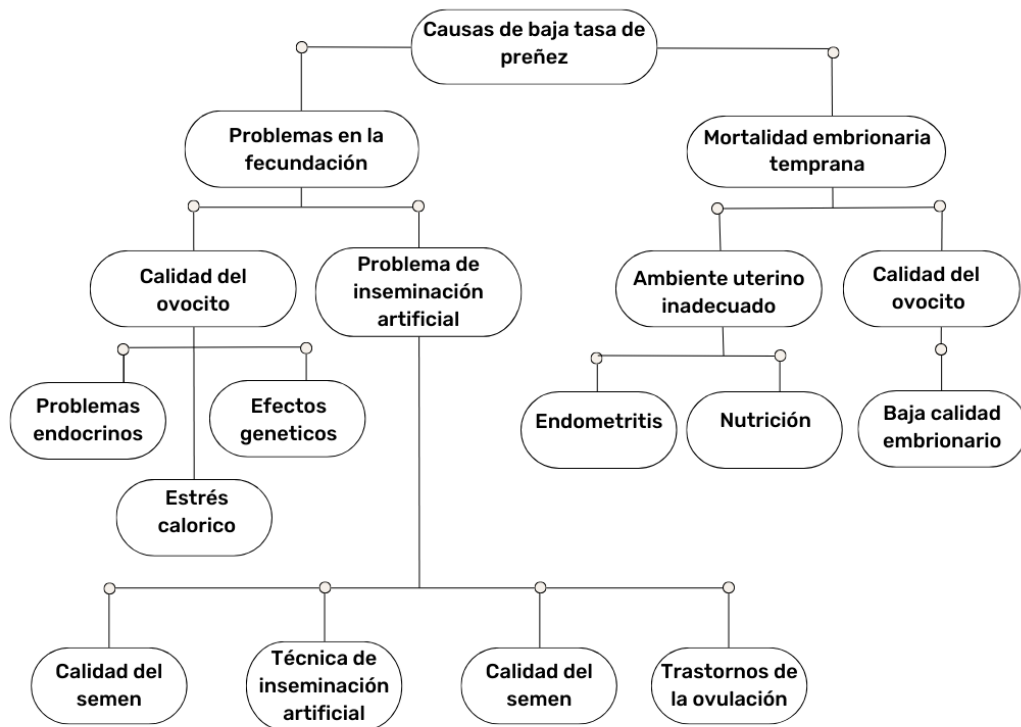


Figura 13. Factores que afectan el éxito reproductivo en bovinos (Nowicki, 2021)

Ferraz *et al.* (2016), informaron un incremento de la tasa de preñez al transferir blastocistos expandidos, embriones de excelente y buena calidad, y un grado de sincronía con la receptora al día 7 y 8. En las vacas paridas, la tasa de preñez se ve afectado por el tipo de embrión, la calidad del embrión, la paridad de las receptoras, los problemas de parto y metritis. La tasa de preñez fue mayor cuando se usaron embriones de excelente y buena calidad, vacas de primer parto, sin problemas de parto y vacas sin metritis, indistintamente. Ashry & Smith (2015) informaron que la tasa de blastocisto de ovocitos procedentes de folículos de >6 mm fue mayor que el de los ovocitos extraídos de los folículos de 2 a 6 mm, como se muestra en la tabla 14.

Tabla 14. Relación de diferentes variables que posiblemente influyen en la TE en la tasa de preñez en vacas nulíparas y multíparas (Ferraz *et al.*, 2016).

Factor	N° TE en Vaquillas	Tasa de preñez en vaquillas %	N° TE en vacas multíparas	Tasa de preñez en vacas multiparas %
Partos de receptoras				
Nulíparas	6285	42.0	-	-
Primíparas	-	-	2235	37.8
Multíparas	-	-	1877	31.6
Tipo de embrión				
Fresco	216	57.4	651	46.5
Congelado	683	40.9	1042	34.2
IVP	5203	41.7	2225	32.5
IVP congelado	183	37.1	194	28.9
Estadio del embrión				
Mórula compacta	1033	37.2	1147	35.9
Blastocisto temprano	1241	34.7	884	33.6
Blastocisto	1695	41.2	1108	33.3
Blastocisto expandido	2316	48.8	973	37.0
Calidad del embrión				
Excelente	4677	45.5	3086	37.3
Bueno	1161	34.6	788	30.1
Regular	447	24.8	238	21.4
Día de TE				
6	1435	38.4	790	32.8
7	2133	44.3	1579	36.3
8	1801	43.0	1357	37.0
9	916	40.7	386	26.9
Problemas de parto				
No	-	-	2475	36.5
Sí	-	-	1637	32.6

Metritis				
No	-		3553	35.7
Sí	-	-	559	30.2

Existen otros factores que pueden influir en el éxito de la preñez después de la TE bovinos producidos *in vitro*, como es el sistema de cultivo de embriones, el número de embriones por receptora, la sincronización del desarrollo del embrión con el día del ciclo estral de la receptora y factores ambientales como el estrés por calor (Ashry & Smith, 2015). Con respecto al embrión, existen etapas críticas en el embrión, las cuales son: fecundación (día 0), la activación del genoma (días 3-4), el desarrollo de blastocisto (días 7-8), la eclosión de los blastocistos (días 8-10), el inicio de la gastrulación (días 11 a 12), la elongación (días 14) y el reconocimiento materno de la preñez (días 15-17) (Speckhart *et al.*, 2023).

III METODOLOGÍA

3.1 Lugar y animales

La recolección de datos se realizó en 3 establos: El Sequión, La Molina y San Martín, ubicados en la cuenca lechera de Lima e Ica. El estudio, tuvo 3 etapas: en la primera se recolectó ovarios de vacas de matadero del centro de faenado local. En la segunda se recuperó ovocitos de donantes vivas, la cual fue realizada en tres hatos comerciales de raza Holstein y Brown Swiss. En la tercera etapa se refiere a la IVP que fue realizada en el Laboratorio Centro de Investigación en Tecnología de Embriones (CIETE) que pertenece al Programa de Investigación en Mejoramiento Animal de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina, ubicado en el distrito de la Molina, Lima, Perú.

Para la recuperación de ovocitos se utilizaron donantes de raza Holstein y Brown Swiss de alta producción de leche (>7000 kg de leche/año), criados bajo sistema intensivo en la cual la alimentación se basa en chala chocleada picada en un 50% y dos a tres ordeños por día..

3.2 Diseño experimental

La tesis se dividió en 04 experimentos.

3.2.1 Evaluación morfocinética del desarrollo embrionario a blastocisto

Los ovarios fueron recolectados en un matadero local, y solo los complejos ovocito-cúmulus (COCs) rodeados por más de tres capas de células de cúmulo granulosa sin expandir fueron seleccionados para maduración *in vitro* (IVM) y fecundación (IVF). Fueron utilizados un total de 96 ovocitos en 6 repeticiones. La evaluación de la morfocinética embrionaria de cigotos cultivados *in vitro*, se realizaron empleando el Sistema de monitoreo continuo (Time-Lapse System, TLS, Primo visión-Suecia). Los posibles cigotos se trasladaron (18 h después de la fecundación) a una placa de 16 micropocillos (16 wells-vitrolife), los cuales se mantenían hasta el día 7.5 en

incubadora a 38°C en una atmósfera humidificada, con CO₂ al 6%. Con el TLS (Figura 14) se evaluaron los siguientes tiempos: t₂ = Momento de división a 2 células; t₃ = Momento de división a 3 células, t₄ = Momento de división a 4 células; t₅ = Momento de división a 5 células; t₈ = Momento de división a 8 células; t_M = Momento de formación de mórula; t_B = Momento de formación del Blastocisto; t_{Bx}=el tiempo de blastocisto expandido.

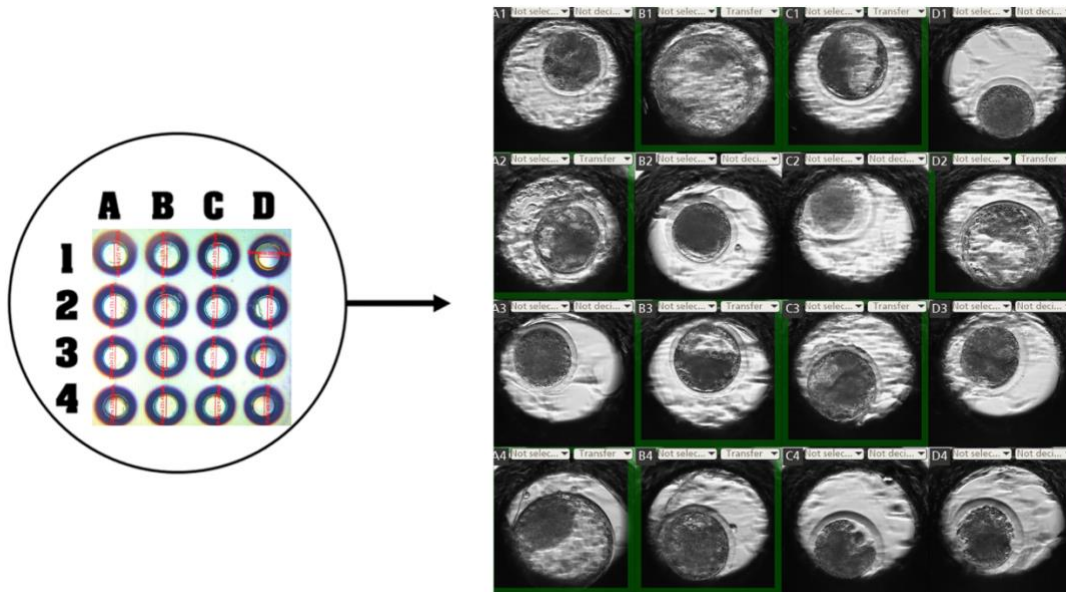


Figura 14. Cultivo de embriones en micropocillos (16 wells-vitrolife) desde cigoto al día 7.5.

3.2.2 Producción de embriones *in vitro* a partir de donantes no superestimuladas

En este experimento fueron seleccionadas vacas de 2 a 5 partos, buena condición corporal (2 a 3.5 en puntaje de 1 a 5) y entre 45 a 150 días de producción de leche. Se realizó 101 y 71 sesiones de aspiración folicular guiada por ultrasonografía de la raza Holstein y Brown Swiss respectivamente. Las donantes no fueron sincronizadas o superovuladas previo a la aspiración folicular. Los COCs recuperados de calidad I, II y III; fueron utilizados para realizar maduración, fecundación y cultivo *in vitro* con medios comerciales (Vitrogen, Brazil) en placas 35x10mm (Falcon®). Se mantuvieron hasta el día 7.5 en incubadora a 38°C en una atmósfera humidificada, con CO₂ al 6%. Se evaluaron la tasa de clivaje y tasa de blastocistos (día 7.5 después IVF). Luego los embriones fueron transferidos a receptoras y la evaluación de preñez se realizó a los 35 días mediante ultrasonido.

Superestimulación y aspiración folicular



Figura 15. Diseño experimental de ovocitos de donantes no superovuladas, transferencia embrionaria y detección de preñez

3.2.3 Producción de embriones *in vitro* a partir de donantes superestimuladas

En este experimento fueron seleccionadas vacas de 2 a 5 partos, buena condición corporal (2 a 3.5 en puntaje de 1 a 5) y entre 120 a 200 días de producción de leche. Se sometieron a sincronización y superestimulación de 264 mg de FSH (Stimufol, Bélgica; 6 dosis decrecientes) y sometidas a aspiración folicular guiada por ultrasonografía. Los COCs recuperados de calidad I, II y III; fueron utilizados para realizar maduración y fecundación *in vitro* con medios comerciales (Vitrogen, Brazil). Los posibles cigotos se trasladaron (18 h después de la fecundación) a una placa de 16 micropocillos (16 wells-vitrolife), los cuales se mantenían hasta el día 7.5 en incubadora a 38°C en una atmósfera humidificada, con CO₂ al 6%. Se evaluaron la tasa de clivaje y tasa de blastocistos (día 7.5 después de IVF), asimismo se evaluó la calidad, estado de desarrollo y diámetro de blastocistos al día 7.5 después de IVF. Los blastocistos al día 7,5 después de IVF, fueron transferidos a hembras receptoras sincronizadas con cuerpo lúteo con diámetro mayor a 15 mm. El diagnóstico de preñez de las receptoras se realizó a los 35 días después de transferencia. Los resultados obtenidos en este estudio fueron utilizados para la predicción de implantación en ecuaciones establecidas en el experimento *in vitro*.

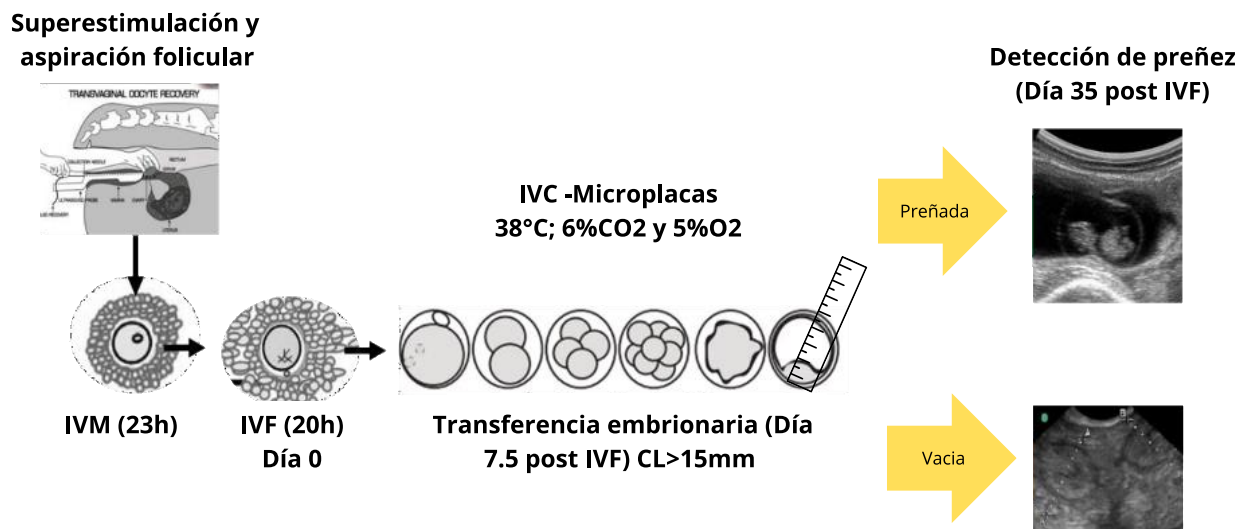


Figura 16. Diseño experimental de ovocitos de donantes no superovuladas y cultivo de embriones en micropocillos (16 wells-vitrolife) desde cigoto al día 7.5.

3.2.4 Validación del modelo matemático para determinar implantación

Para evaluar el potencial predictivo de la característica del blastocisto a la trasferecia con la implantación (preñez), se utilizó el modelo matemático 3 generado por regresión logística binaria y publicada por Huayhua *et al.* (2023) en condiciones *in vitro* para predecir viabilidad embrionaria *in vitro* con valor de AUC (área debajo la curva) de 0.90 como se muestra en la table 15.

Tabla 15. Modelo predictivo no invasivo de viabilidad *in vitro* con el uso de regresión logística binaria.

Variable	B	95% CI de OR	P valor
Constante	-24.393		0.000
D75	0.125	1.077 – 1.192	0.000

Siendo la ecuación lineal del modelo, constituida con una variable:

$$Y = \ln[p/(1-p)] = -24.393 + 0.125 * D75$$

Siendo la probabilidad estimada:

$$p = \text{Exp } Y / (1 + \text{Exp } Y)$$

Donde:

ln logaritmo natural, log exp, donde $\exp = 2.71828\dots$

$p > 0.5$, Predice preñez

$p < 0.5$, Predice, no preñez

3.3 Preparación de donadoras: sincronización y superestimulación de ovocitos

Las donantes utilizadas para aspiración folicular en el experimento 2, no fueron sincronizadas, ni superestimuladas. Para el experimento 3, la sincronización de donantes comenzó con una distribución al azar en dos tratamientos: control (no se aplica la somatotropina recombinante) y rBST (aplicación de somatotropina recombinante). Un total de 32 vacas Holstein (1 a 4 partos) fueron superestimuladas, de las cuales 20 vacas tuvieron un tratamiento control y 12 vacas un tratamiento con rBST. El día 0, inicio con la inserción de implante vaginal con 1.0 g de progesterona (Sincrogest®, Ourofino, Brasil), 2 mg de Estradiol (Benzoato de Estradiol Von Franken®, Von Franken, Argentina) y aplicación o no de somatotropina recombinante 500 mg de rBST (Boostin® - S, MSD Health, EE.UU.) Al día 4 se inicio la superestimulación ovarica con aplicaciones diarias de FSH en dosis decreciente con un intervalo de 12 horas, totalizando 06 dosis con una dosis total de 264 mg de FSH (Stimufol®, Reprobio, Belgica). El día 8, 54 horas después de la última dosis de FSH, se retiro el implante de progesterona y se realizo la aspiracion folicular.

3.4 Producción de embriones *in vitro* en bovinos

El contenido del fluido folicular aspirado de los diferentes experimentos fue llevado al laboratorio en donde fue filtrado y se procedió con la búsqueda de los ovocitos y selección. Los ovocitos (COCs) que pasaron a maduración son de calidad 1 y 2 en el experimento 1 (ovarios de camal) y de calidad 1, 2 y 3 en el experimento 2 y 3. Los ovocitos seleccionados y clasificados fueron

lavados en medio de manipulación y en medio de maduración IVM® (Vitrogen, Brasil). Se prepararon 4 microgotas de 70µL de medio IVM® en placas de cultivo de 35x10mm (Falcon®), las cuales fueron cubiertas con aceite mineral previamente incubados en 38 °C y mezcla de gases 6% CO₂, 6% O₂, 89% N₂ en una atmósfera humidificada por 2 horas. Se colocó hasta 15 COCs por microgota de medio IVM® y finalmente se llevó a la incubadora con mezcla de gases 6% CO₂, 6% O₂, y 89% N₂ y en una atmósfera humidificada por 22 a 24 horas.

Después de las 22 a 24 horas de maduración, los ovocitos fueron retirados del medio de maduración y lavados en gotas de medio de lavado espermático y fecundación IVF® (Vitrogen, Brasil). Luego, fueron colocados en grupos de hasta 15 ovocitos en microgotas de 70 µL de medio de fecundación IVF® en placas Petri de 35x10 mm, cubiertos con aceite mineral, previamente incubados en 38 °C y mezcla de gases 6% CO₂, 6% O₂, 89% N₂ en una atmósfera humidificada por 2 horas. En el experimento 1 se utilizó una pajilla de 0,5 mL de semen congelado de toros provenientes del Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria La Molina. En el experimento 2 y 3, se utilizó semen sexado de 0,25 mL de toros importados. Para seleccionar y capacitar los espermatozoides se utilizó el método de Percoll 45/90 o Percoll 35/70 para pajillas de semen convencional y sexado respectivamente, en un microtubo de 1,5 mL se hizo una dilución de 200 µL de Percoll (Vitrogen®, Brasil) para semen convencional o Percoll Sexado (Vitrogen®, Brasil) para semen sexado y 200 µL de Sperm (Vitrogen®, Brasil); en la parte inferior se colocó 400 uL Percoll (Vitrogen®, Brasil) para semen convencional o Percoll Sexado (Vitrogen®, Brasil) para semen sexado, previamente calentado a 38°C, luego se descongeló una pajilla y se colocó en la parte superior. La primera centrifugación se realizó a 4000 RPM (semen convencional) o 7000 RPM (semen sexado) por 6 minutos, posteriormente, se retiró 100 ul del pellet formado. Se le adicionó 400 µL de medio de fecundación IVF® (Vitrogen®, Brasil). Nuevamente, se llevó a centrifugar a 3000 RPM (semen convencional) o 4000 RPM (semen sexado) por 3 minutos, se retiró 100 ul del pellet formado y se colocó en un vial. Para fecundar, se colocó entre 10 y 20 ul según la cantidad de ovocitos en cada microgota. Finalmente, se llevó a la incubadora a 38 °C y mezcla de gases 6% CO₂, 6% O₂, 89% N₂ en una atmósfera humidificada por 18 horas.

Después de las 18 a 20 h, los ovocitos fueron retirados del medio de fecundación y lavados en gotas

de medio de cultivo IVC® (Vitrogen, Brasil). En el experimento 1 y 3, los posibles cigotos se trasladaron (18 h después de la fecundación) a una placa de 16 micropocillos (16 wells-vitrolife) y en el experimento 2 se trasladaron a placas de 35x10mm (Falcon®). Los posibles cigotos en las diferentes placas se mantuvieron hasta el día 7.5 en incubadora a 38°C en una atmósfera humidificada, con CO₂ al 6%.

Los embriones de calidad 1, 2 y 3, y estadio de desarrollo entre mórula a blastocisto eclosionado expandido fueron cargados en pajillas de 0.25ml. Cada pajilla estuvo formada de tres columnas de medio de manipulación, en el cual el embrión se cargó en la segunda columna. Las pajillas de embriones fueron trasladadas dentro de la incubadora portátil (Minitube®, Alemania) por aproximadamente 3 horas.

3.5 Sincronización, transferencia y diagnóstico de preñez de receptoras

Para las receptoras se usaron 2 tratamiento de sincronización.

Experimento 2: se utilizaron 30 vacas Holstein receptoras, sin problemas reproductivos y de 1 a 4 partos. La sincronización comenzó con la aplicación de prostaglandina F₂ alfa en presencia de cuerpo lúteo. Al día 4 aproximadamente se detectó celo, para luego al día 11.5 aproximadamente hacer la transferencia.

Experimento 3: se utilizaron 50 vacas Holstein receptoras, sin problemas reproductivos y de 1 a 4 partos. La sincronización de las vacas comenzó con la aplicación de 100 ug GnRH (día 0), al día 7 y 8 se procedió a la aplicación de 100 ug de D-coprostenol (prostaglandina F₂ alfa). En el día 10 se colocó la dosis de 100 ug GnRH. Finalmente, al día 17, las vacas que presente un cuerpo lúteo mayor a 15 mm de tamaño fueron transferidos con blastocistos producidos in vitro.

En el experimento 2 y 3, la transferencia de embriones se realizó en el cuerno uterino ipsilateral y el diagnóstico de preñez fue realizado utilizando ultrasonografía transrectal al día 35 post transferencia.

3.6 Análisis estadístico

En el experimento 1, los parámetros cinéticos de las divisiones embrionarias t2, t3, t4, t5, t8, t9+, tM, tSB, tB y tBX se analizaron con la prueba ANOVA.

Las variables respuesta del experimento 2 y 3, producción de embriones *in vitro* a partir de donantes no superestimuladas/ superestimuladas fueron analizados mediante la prueba de ANOVA. Además, los resultados de la tasa de preñez de los embriones transferidos del experimento 2 y 3 fueron analizados mediante la prueba prueba Kruskal-Wallis.

Para el experimento 4, la evaluación del modelo matemático, se determinaron con el cálculo de los valores de P(logit) y la probabilidad, siendo la variable analizada el diámetro del embrión versus la implantación del embrión (preñez).

El análisis de ANOVA, Kruskal-Wallis. Y regresión logística binaria se realizó con el programa IBM SPSS Statistics versión 19 (IBM, Armonk, NY, EE. UU.).

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación morfocinética del desarrollo embrionario a blastocisto

Se analizaron un total 96 presuntos cigotos *in vitro* cultivados en placas de micropocillos desde la etapa de cigoto hasta blastocisto expandido mediante un control continuo con el uso del equipo de time lapse. La tasa de primera escisión fue de 68,75%, obteniendo valores menores a los reportados por Somfai *et al.* (2010) 89,0%, Ferré *et al.* (2020) 77,5%, Damayanti *et al.* (2020) 74,6% y Huayhua *et al.* (2023) 83,7%. La tasa de blastocitos fue del 31,25%, como se muestra en la figura 17, obteniendo valores similares a Quispe *et al.* (2018) 30,5% y Ahuja Aguirre *et al.* (2009) 31,6% y diferente a Somfai *et al.* (2010) 46,2% y Huayhua *et al.* (2023) 42,8%.

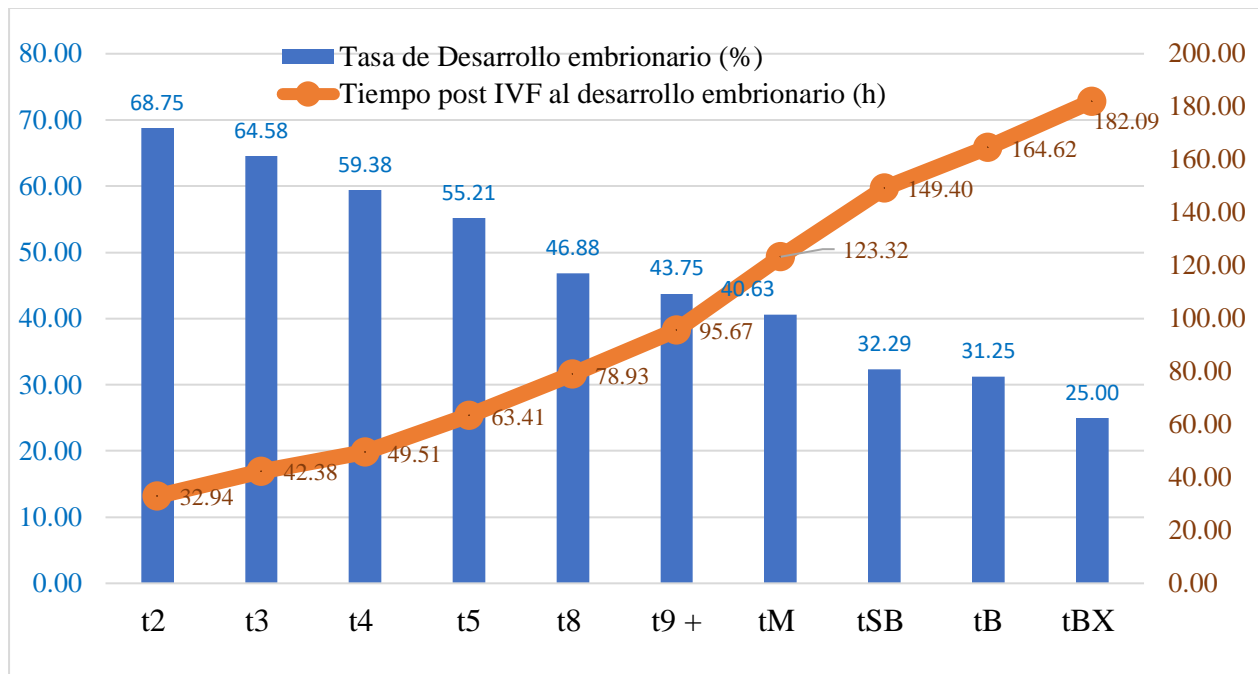


Figura 17. Tasa de división celular de embriones bovinos (A) y patrón de cinética embrionaria desde el cigoto hasta el blastocisto expandido usando monitoreo continuo con el equipo de time lapse

El tiempo medio hasta la primera escisión y hasta los blastocitos expandidos fue de 32,94 y 182.09h, respectivamente. El momento de la primera escisión del cigoto se ha asociado con varios parámetros como es el número de blastómeros y el tiempo hasta la primera división. Se asociaron estos parámetros con su competencia para convertirse en una mórula compacta o en un blastocisto (Somfai *et al.*, 2010; Yaacobi-Artzi *et al.*, 2022), como muestra Sugimura *et al.*, (2012) en su estudio que el 77,8% de los blastocistos fueron de cigotos que se dividieron en 2 blastómeros al final de la primera escisión.

El patrón cinético del embrión bovino y el tiempo desde el cigoto hasta la formación de blastocisto expandido se monitorearon con un control continuo con ayuda del equipo de time lapse. Los embriones que se desarrollaron hasta t4 y hasta TBX, se diferencian en el tiempo de primera, segunda y tercera división. Además, comparando los embriones que se desarrollaron hasta 9 células, aparición del blastocele y blastocisto expandido se ve una diferencia en el tiempo de división desde t5, como se muestra en la figura 18. La cinética de los embriones bovinos IVP está relacionada con la viabilidad embrionaria, el metabolismo y los patrones epigenéticos (Silva *et al.*, 2016). Holm (1998), informa que el promedio de la primera división de embriones a las 35.6h no lograron desarrollarse hasta 9 células o mórula temprana, estos resultados son similares a los obtenidos por este estudio, donde los embriones que se dividieron solo hasta 4 células tuvieron un promedio de primera división a las 34.76h.

El desarrollo de embriones hasta blastocisto expandido fue de cigoto que se dividieron por primera vez a las 29.98hpi. Lechniak *et al.* (2008), agrupa varios estudios e informa que los embriones de mejor calidad surgen de cigotos que se dividen a las 30hpi y el potencial de desarrollo disminuye a medida que aumenta el tiempo desde la inseminación hasta la primera escisión. Los embriones de 2 células luego de 112 h después de la fertilización se desarrollan lentamente obteniendo una mayor expresión de genes relacionados con la apoptosis y el estrés celular alrededor en comparación con los embriones de desarrollo rápido n. La interrupción del desarrollo del embrión se debe a etapas críticas, algunas de ellas son: fecundación (día 0), la activación del genoma (días 3-4) y el desarrollo de blastocisto (días 7-8), (Speckhart *et al.*, 2023). La etapa de ocho a dieciséis células de los embriones bovinos es el periodo de mayor actividad genómica (Graf *et al.*, 2014).

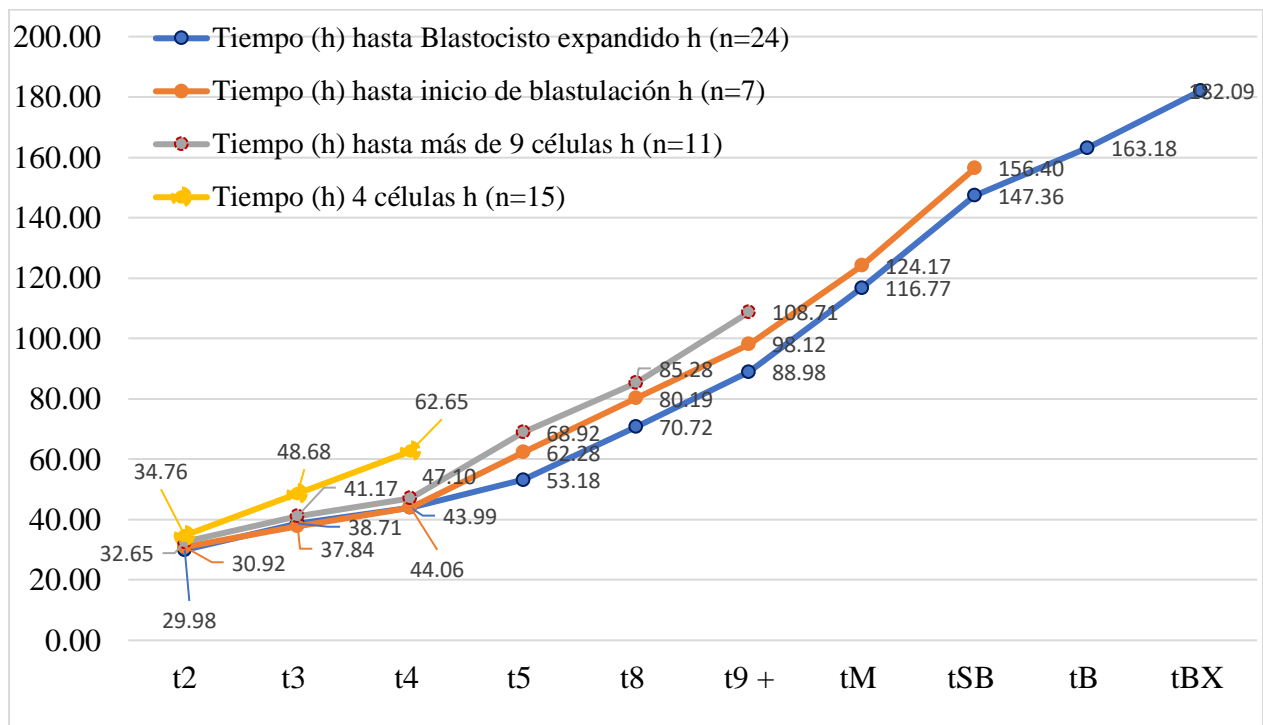


Figura 18. Patrón de cinética de embriones bovinos y tiempo de formación de blastocistos expandidos medidos mediante un control continuo con ayuda del equipo de time lapse. A) Parámetros cinéticos de las divisiones celulares embrionarias t2, t3, t4, t5, t8, t9+, tM, tSB, tB y tBX.

4.2 Producción de embriones *in vitro* a partir de donantes no superestimuladas

En la Tabla 15, los resultados muestran variaciones significativas en la cantidad de COCs recuperados entre diferentes grupos y razas en vacas no superestimuladas. Para vacas Brown Swiss del estable La Molina (Brown Swiss – M), se recuperaron en promedio 3.57 ovocitos por sesión, mientras que para las vacas Holstein del estable La Molina (Holstein – M), la cifra promedio fue de 8.31 ovocitos por sesión. Para vacas Brown Swiss del estable El Sequion (Brown Swiss – S), el promedio fue de 6.38, mientras que para las vacas Holstein del estable El Sequion (Holstein – S) fue de 6.35. En cuanto a los COCs viables, que son aquellos con potencial para desarrollarse en embriones exitosamente, se observan diferencias marcadas. La Brown Swiss – M mostró un

promedio de 2.76, mientras que la Holstein – M presentó un valor de 6.71. Para la Brown Swiss – S, el promedio se redujo a 5.15, y para la Holstein – S fue de 5.40. Estos resultados son menores a los reportados por Ferre *et al.* (2020) de 7.8 ovocitos en vaca en *Bos taurus*, Seneda *et al.* (2001) de 4.13, Gallego *et al.* (2022) de 4 a 5, Gutierrez-Reinoso *et al.* (2022) reporta 5,9 ovocitos, teniendo una tasa de COC viables de 64,3%. La diferencia entre los ovocitos recuperados y viables se puede ver afectados por la alimentación, debido a que afecta a la calidad de los ovocitos, una alimentación adecuada es beneficioso para los ovocitos de animales de baja condición corporal pero perjudicial para los ovocitos de animales de condición corporal moderadamente alta (Adamiak *et al.*, 2005). Además, estudios reportan que el número y la calidad de los ovocitos recuperados después de la OPU son afectados por el tamaño del folículo y la etapa de desarrollo. Es por eso que se recomienda la sincronización de onda folicular ya que ovocitos derivados de folículos uniformes de tamaño mediano mejora el porcentaje de COCs viables y de blastocistos (Hayden *et al.*, 2022). En general el número de ovocitos obtenidos a través de OPU puede variar debido a factores como la raza de la vaca, condición corporal, edad, el uso de estimulación hormonal, la presión de aspiración, el momento del ciclo estral en el que se realiza la aspiración y el diámetro de la aguja de aspiración, entre otros (Morera-Jiménez *et al.*, 2022).

Tabla 16. Eficiencia de IVP a partir de donante de razas lecheras no superestimuladas

	Sesiones	COCs recuperados	COCs Viables	Tasa de clivaje	Tasa de blastocistos	Blastocisto transferible/donante
Brown Swiss - M	46	3.57 ± 2.49 ^a	2.76 ± 2.00 ^a	58.80% ^c	13.10%	0.33
Holstein - M	51	8.31 ± 9.23 ^b	6.71 ± 8.92 ^b	65.83% ^a	8.21%	0.65
Brown Swiss - S	55	6.38 ± 4.38 ^b	5.15 ± 3.00 ^b	56.59% ^d	18.90%	0.97
Holstein – S	20	6.35 ± 3.96 ^{ab}	5.40 ± 3.72 ^{ab}	57.10% ^b	5.70%	0.31

Finalmente, al considerar la relación embrión/donante, se destaca que la Brown Swiss – S presentó el valor más alto con 0.97, seguida por Holstein – M con 0.65, Brown Swiss – M con 0.33 y Holstein – S con 0.31. Estos resultados son bajos comparados con Hendriksen *et al.* (2000) que menciona que solo el 15 al 20% de los ovocitos producen embriones transferibles. Según Amaral *et al.* (2022) el 40% y Mucci *et al.* (2006) el 25-40% alcanza el estadio de blastocisto.

La producción de embriones se ve afectada por la raza de donantes, la población folicular y el número de ovocitos viables recuperados. Además, La técnica de OPU para obtener ovocitos induce lesiones del tejido ovárico, especialmente en donantes cuyos folículos ováricos se aspiran con frecuencia (Lacerda *et al.*, 2020). El porcentaje de blastocistos se puede deber a alteraciones de las condiciones básicas de maduración, ya que afecta significativamente a la competencia de los ovocitos y la composición epigenética normal (Sirard & Coenen, 2006). Está claro que el folículo puede influir en la calidad del ovocito obtenido en la ovulación y, como resultado, en la calidad del embrión obtenido.

Existen diferencias entre la calidad y cantidad de ovocitos recuperados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía transvaginal en las diferentes razas, en Holstein se encontró 5.3 y 2.1 ovocitos recuperados y viables respectivamente, en Brown Swiss se encontró 7 y 2.4 ovocitos recuperados y viables respectivamente, afectando de esta manera la tasa de blastocisto (Quispe *et al.*, 2015). Además, las vacas con recuento de folículos antrales alto presentaron un mayor número de embriones *in vitro* en comparación con las vacas con recuento de folículos antrales afectado la tasa de embriones (Zangirolamo, 2018).

4.3 Producción de embriones *in vitro* a partir de donantes superestimuladas

En la tabla 16, se muestra los COCs recuperadas en vacas superestimuladas con/sin rbST. Para vacas con "Superestimuladas + rbST", la cantidad promedio COCs recuperados y viables fue de 6.08 y 5.67 por sesión respectivamente, mientras que en vacas "Superestimuladas", se obtuvo un promedio de COCs recuperados y viables de 9 y 8.45 por sesión respectivamente. En el grupo de "Superestimuladas" se obtiene un promedio parecido a los reportados por Ciftci & Dinc, (2023) de 9 y 6; y Baruselli *et al.* (2016) 9.2 y 4,7 ovocitos recuperados y viables respectivamente. El uso de tratamientos de superestimulación con FSH permite la recuperación de ovocitos con mayor viabilidad y competencia para la fecundación y el posterior desarrollo en embriones de calidad óptima para transferencia (Kim & Yi, 2023; Ongaratto *et al.*, 2020). Además, las dosis repetidas de FSH antes de OPU proporcionan una población de folículos homogénea y aumentan el

rendimiento de ovocitos y blastocistes (Ciftci & Dinc, 2023). Sin embargo, la respuesta ovárica después del tratamiento de superestimulación es muy variable: un tercio de las donantes tratadas no responde a la superovulación, otro tercio produce un promedio de uno a tres embriones y solo un tercio realmente superovula dando una gran cantidad de embriones (Machaty *et al.*, 2012). Además, las dosis repetidas de preparados de FSH son desventajosas porque aumentan la carga de trabajo y el estrés en los animales. (Ciftci & Dinc, 2023)

Tabla 17. Eficiencia de producción de embriones *in vitro* a partir de donantes de razas lecheras superestimuladas tratadas con/sin somatotropina

Tratamiento	Sesiones	COCs recuperados	COCs Viables	Tasa de clivaje	Tasa de blastocistos	Blastocisto transferible/donante
Superestimuladas	20	9.00 ± 5.30	8.45 ± 4.74	63.95%	28.75%	2.6
Superestimuladas+rbST	12	6.08 ± 2.47	5.67 ± 2.50	57.89%	18.70%	1.08

En el grupo "Superestimuladas", se obtuvo un promedio de 2.6 blastocistos, mientras que en el grupo "Superestimuladas+rbST", el promedio fue de 1.08 blastocistos por sesión. Se observa que la tasa de blastocistos fue del 28.75% en el grupo "Superestimuladas" y del 18.70% en el grupo "Superestimuladas+rbST". Los resultados no indican diferencias significativas en la IVP entre los dos grupos. Los resultados del grupo de "Superestimuladas", son altas en comparación con las reportadas por Baruselli *et al.* (2016) de 0.5 y 4.3% promedio de blastocistos y tasa de blastocistos respectivamente. Una de las funciones de rbST es regular la producción y secreción del factor de crecimiento insulínico (IGF-I). La rbST y el IGF-I favorecen la maduración del ovocito, tasa de fecundación, desarrollo embrionario temprano, función del cuerpo lúteo y reconocimiento materno de la gestación (Hernández-Cerón & Gutierrez-Aguilar, 2013).

En este estudio se ve una reducción de COCs recuperados y viables aplicando rbST en el día 0 del protocolo de superestimulación, esto puede deberse a que según Jousan *et al.* (2007) después de

la inyección subcutánea de 500 mg de rbST, al día 7 los niveles de IGF-I se estabiliza y se mantienen elevados por 7 días más, sin embargo en este estudio la aplicación de rbST no se realizó 7 días antes para estabilizar los niveles de IGF-I, generando niveles no estables de IGF-I al momento del inicio de la onda folicular afectando la cantidad y calidad de COCs. Además, Jousan *et al.* (2007) demuestra que la repetición de la inyección cada 14 días mantiene niveles de IGF-I altos, sin embargo en este estudio solo se aplicó la rbST al día 0 pudiendo afectar la tasa de blastocistos al día 16.5 después del inicio de la superovulación.

La adición *in vitro* de rbST al medio de cultivo favorece la maduración del ovocito y aumenta la tasa de clivaje. Así como también la modificación del ambiente uterino, lo cual favorecería las condiciones del desarrollo embrionario y con ello su capacidad para producir Interferón Tau (Hernández-Cerón & Gutierrez-Aguilar, 2013), sin embargo en este estudio no se consideró estos factores y solo se aplicó una dosis de 500mg de rbST en el día 0 de la superestimulación. Esta reducción de los niveles de rbST puede afectar negativamente el desarrollo de los embriones, así como también la tasa de preñez. Según algunos estudios reportados Starbuck *et al.*, (2006) informa que la aplicación de 500mg rbST en la inseminación aumento las tasas de concepción en vacas lecheras de lactación mayor a 100 días. Además, (Hasler *et al.*, 2003) reportó que no existe diferencia cuando se aplica rbST en el momento de la transferencia embrionaria y según Moreira *et al.* (2002), el número de embriones es mayor de receptoras tratadas con rbST. La tasa de preñez fue de 56.1% cuando solo se aplicó 500mg de rbST en el momento de la inseminación a la donadora, mas no a la receptora

4.4 Tasa de preñez de embriones *in vitro* a partir donantes de razas lechera con/sin superestimulación

Según la tabla 17 los embriones transferidos indica el número total de embriones transferidos a las receptoras en cada grupo de donantes. Del grupo de donantes no superestimuladas, se transfirieron

un total de 33 embriones, mientras que del grupo de donantes superestimuladas, se transfirieron 48 embriones. En cuanto a las receptoras preñadas al día 40; del grupo de donantes no superestimuladas, 8 receptoras estaban preñadas, mientras que del grupo de donantes superestimuladas, solo 5 receptoras estaban preñadas en este período. Al final, la tasa de preñez muestra la proporción de receptoras que resultaron preñadas sobre el total de receptoras en cada grupo, expresada como un porcentaje. En el grupo de donantes no superestimuladas, la tasa de preñez fue del 24.24%, mientras que en el grupo de donantes superestimuladas, la tasa de preñez fue del 10.42%. Según Do *et al.* (2018) la tasa de preñez de embriones *in vitro* deben ser cargados en pajillas con medio de transferencia de embriones (suplementado con suero fetal bovino al 10%), las pajillas deben mantenerse calentadas en la incubadora transportable hasta que los embriones sean transferidos, obteniendo una tasa de preñez de 41.3% al día 35 y Al-Katanani *et al.* (2002) reporta el uso de medio de TL-HEPES suplementado con 3 mg/ml de albumina sérica bovina para el cargado de la pajilla y transportado en incubadora portátil a 39,0°C. Los embriones bovinos frescos se pueden almacenar durante 6 a 8 horas a aproximadamente 21 °C o hasta 24 horas a 38.9°C en un medio de cultivo especial obteniendo una tasa de preñez de 56.3% (Echternkamp & Elliott, 1988), sin embargo en este estudio se utilizó medio de manipulación sin suplementación, como medio de transporte, generando un posible efecto en la viabilidad del embrión.

Tabla 18. Eficiencia de IVP a partir de donantes de razas lecheras superestimuladas.

	Embriones transferidos	Receptoras preñadas a 40 días	Tasa de preñez
Donantes no superestimuladas	33	8	24.24%
Donantes superestimuladas	48	5	10.42%

La superestimulación ovárica en donantes de razas lecheras ha sido ampliamente utilizada para aumentar el número de ovocitos recuperados y, en consecuencia, mejorar la eficiencia en la IVP. Sin embargo, investigaciones recientes sugieren que el éxito de esta técnica puede ser variable y depende de varios factores. Vieira *et al.* (2015), Loureiro *et al.* (2011), Bó *et al.* (2016) señalan que, si bien la superestimulación puede aumentar la cantidad de ovocitos recuperados, esto no

siempre se traduce en una mayor tasa de preñez en las receptoras después de la TE debido a que la calidad de los embriones producidos a partir de estos ovocitos puede ser igual o incluso inferior en términos de viabilidad y capacidad de implantación. Esto sugiere que la respuesta individual de los animales y la calidad de los ovocitos recuperados pueden ser determinantes en la eficacia de la superestimulación ovárica para la IVP.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el grupo de donantes superestimuladas, la tasa de preñez fue del 10.42%. Zavattieri, (2017), Fuentes, (2015) y Velasquez, (2021), señala que existen ciertas variables que influyen el éxito de preñez luego de la transferencia de embriones *in vitro* en bovinos, como es el número de embriones transferidos, la coordinación del desarrollo embrionario con el ciclo estral de la receptora y factores ambientales como el estrés por calor. Respecto al desarrollo embrionario, se identifican etapas críticas que incluyen la fecundación, la activación del genoma, el desarrollo del blastocisto, la eclosión, la gastrulación, la elongación y el reconocimiento materno de la preñez. Rabel *et al.* (2023) indica que el 73% de los casos preñez fallida se deben, en parte, a la calidad del embrión. Esto ocurre como resultado de evaluaciones morfológicas incorrectas basada en evaluaciones visuales, que es el método utilizado actualmente para evaluar los embriones antes de la transferencia.

La investigación sobre la eficiencia de IVP en donantes de razas lecheras, tanto superestimuladas como no superestimuladas, destaca la complejidad de estos procesos y la necesidad de considerar múltiples factores para lograr resultados óptimos en la reproducción asistida en la industria ganadera lechera.

4.5 Validación del modelo matemático para determina implantación

El monitoreo usando el equipo time lapse es un método eficaz para la obtención de imágenes continuas del desarrollo de cada embrión individual *in vitro*, lo que permite la predicción del crecimiento y el potencial de desarrollo del embrión bovino a través de parámetros morfocinéticos como el momento de la escisión, la dinámica morfológica, la velocidad de desarrollo, la simetría de la división celular y el alcance de la fragmentación citoplasmática (Sugimura *et al.*, 2017). En

este ítem, se evaluó el modelo matemático 3 de la investigación “Momento de blastulación para seleccionar embriones viables monitoreada por tecnología time-lapse” realizado en el laboratorio CIETE y publicado en la revista Plos One para determinar la predicción de implantación con relación al diámetro del embrión al día 7.5 (Huayhua *et al.*, 2023).

En la tabla 19 no hubo coincidencias en la predicción determinada según la ecuación de Huayhua *et al.* (2023) con respecto a los resultados de implantación obtenidos en este estudio, es por eso que el modelo matemático no representa la predicción de preñez, en la cual se utilizó la medida diámetro del embrión al día 7.5. Los resultados son pocos confiables, debido a que en el presente estudio se utilizó ovocitos recuperados por método OPU y el uso de semen sexado en la fecundación. Debemos tener en consideración que la selección de hembras de características similares puede ser un factor que mejore la capacidad implantadora del embrión (Ferraz *et al.*, 2016), así como también el transporte de embriones y calidad del embrión (Ferraz *et al.*, 2016; Rabel *et al.*, 2023).

Tabla 19. Predicción de la implantación embrionaria determinada con el tamaño del blastocisto al día 7.5 de transferencia a receptoras.

#	Diámetro	Y	p	Predicción	Preñez 35 días
1	166.54	-3.576	0.03	No preñez	No preñez
2	155.70	-4.930	0.01	No preñez	No preñez
3	147.66	-5.935	0.00	No preñez	No preñez
4	164.70	-3.806	0.02	No preñez	No preñez
5	154.20	-5.117	0.01	No preñez	No preñez
6	147.90	-5.906	0.00	No preñez	No preñez
7	142.26	-6.610	0.00	No preñez	No preñez
8	179.88	-1.909	0.13	No preñez	Preñez
9	284.70	11.194	1.00	Preñez	No preñez
10	140.05	-6.887	0.00	No preñez	No preñez

11	171.89	-2.907	0.05	No preñez	No preñez
12	142.48	-6.584	0.00	No preñez	No preñez
13	165.74	-3.676	0.02	No preñez	No preñez
14	144.15	-6.374	0.00	No preñez	No preñez
15	138.24	-7.113	0.00	No preñez	No preñez
16	181.74	-1.676	0.16	No preñez	No preñez
17	151.05	-5.511	0.00	No preñez	No preñez
18	141.67	-6.684	0.00	No preñez	No preñez
19	256.80	7.707	1.00	Preñez	Preñez
20	186.60	-1.069	0.26	No preñez	No preñez
21	231.68	4.567	0.99	Preñez	No preñez
22	161.76	-4.173	0.02	No preñez	No preñez
23	133.53	-7.702	0.00	No preñez	No preñez
24	160.98	-4.270	0.01	No preñez	No preñez
25	169.90	-3.156	0.04	No preñez	No preñez
26	151.46	-5.460	0.00	No preñez	No preñez
27	148.94	-5.775	0.00	No preñez	No preñez
28	144.81	-6.292	0.00	No preñez	No preñez
29	137.77	-7.171	0.00	No preñez	No preñez
30	200.56	0.677	0.66	Preñez	No preñez
31	142.14	-6.625	0.00	No preñez	No preñez
32	163.95	-3.899	0.02	No preñez	No preñez
33	194.35	-0.099	0.48	No preñez	No preñez
34	176.21	-2.367	0.09	No preñez	No preñez
35	360.25	20.638	1.00	Preñez	No preñez
36	263.79	8.581	1.00	Preñez	No preñez
37	240.18	5.630	1.00	Preñez	No preñez
38	143.98	-6.396	0.00	No preñez	No preñez
39	155.26	-4.986	0.01	No preñez	Preñez

40	142.36	-6.598	0.00	No preñez	No preñez
41	153.38	-5.221	0.01	No preñez	No preñez
42	197.72	0.322	0.58	Preñez	No preñez
43	192.18	-0.370	0.41	No preñez	No preñez
44	139.61	-6.942	0.00	No preñez	No preñez
45	148.20	-5.868	0.00	No preñez	No preñez
46	175.96	-2.398	0.08	No preñez	No preñez
47	147.51	-5.954	0.00	No preñez	No preñez
48	178.04	-2.138	0.11	No preñez	No preñez

V CONCLUSIONES

Basado en los resultados de este trabajo citamos las siguientes conclusiones:

- Los cigotos que tienen una primera división tardía (>30 horas) no llegan a desarrollarse hasta blastocisto expandido. Asimismo, la tasa de blastocisto a partir de ovocitos madurados fue de 25% y arribaron al estado de blastocisto a las 163 h después de IVF.
- El número de blastocistos transferibles por donante en vacas superestimuladas (2.03) fue mayor vs no superovuladas (0.63), respectivamente.
- La tasa de preñez de blastocistos transferidos de donantes no superestimuladas (24.24) fue mayor vs superovuladas (10.42%), Asimismo, los datos de preñez (implantación) de receptoras no permitió validar el modelo matemático para la selección morfocinética de embriones bovinos.

VI RECOMENDACIONES

- El análisis morfocinético del desarrollo embrionario debe ser analizado con un número mayor de embriones en bovinos
- Utilizar protocolos de superovulación que permita maximizar la recuperación de ovocitos competentes para IVF.
- Evaluar los factores que pueden afectar la preñez de embriones transferidos a receptoras, tales como: Medios y tiempos de transporte de embriones para la transferencia.
- La validación del modelo matemático generado por regresión logística binaria requiere una mayor profundidad en el análisis.

VII BIBLIOGRAFÍA

1. Adamiak, S. J., Mackie, K., Watt, R. G., Webb, R., & Sinclair, K. D. (2005). Impact of nutrition on oocyte quality: Cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biology of Reproduction*, 73(5), 918-926. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.041483>
2. Adhikari, B., Lee, C. N., Khadka, V. S., Deng, Y., Fukumoto, G., Thorne, M., Caires, K., Odani, J., & Mishra, B. (2022). RNA-Sequencing based analysis of bovine endometrium during the maternal recognition of pregnancy. *BMC Genomics*, 23, 494. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08720-4>
3. Aguila, L., Treulen, F., Therrien, J., Felmer, R., Valdivia, M., & Smith, L. C. (2020). Oocyte Selection for In Vitro Embryo Production in Bovine Species: Noninvasive Approaches for New Challenges of Oocyte Competence. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 10(12), 2196. <https://doi.org/10.3390/ani10122196>
4. Ahuja Aguirre, C., Montiel Palacios, F., Pérez Hernández, P., & Gallegos Sánchez, J. (2009). Medio alternativo para la producción in vitro de embriones bovinos. *Zootecnia Tropical*, 27(3), 277-284.
5. Al-Katanani, Y. M., Drost, M., Monson, R. L., Rutledge, J. J., Krininger, C. E., Block, J., Thatcher, W. W., & Hansen, P. J. (2002). Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology*, 58(1), 171-182. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00916-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00916-0)
6. Amaral, T. F., de Grazia, J. G. V., Martinhao, L. A. G., De Col, F., Siqueira, L. G. B., Viana, J. H. M., & Hansen, P. J. (2022). Actions of CSF2 and DKK1 on bovine embryo development and pregnancy outcomes are affected by composition of embryo culture medium. *Scientific Reports*, 12, 7503. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11447-7>
7. Anagnostopoulou, C., Maldonado Rosas, I., Singh, N., Gugnani, N., Chockalingham, A., Singh, K., Desai, D., Darbandi, M., Manoharan, M., Darbandi, S., Leonardi Diaz, S. I., Gupta, S., Henkel, R., Sallam, H. N., Boitrelle, F., Wirka, K. A., & Agarwal, A. (2022). Oocyte quality and embryo selection strategies: A review for the embryologists, by the

- embryologists. *Panminerva Medica*, 64(2), 171-184. <https://doi.org/10.23736/S0031-0808.22.04680-8>
8. Ashry, M., & Smith, G. W. (2015). Application of embryo transfer using in vitro produced embryos: Intrinsic factors affecting efficiency. *Cattle practice : journal of the British Cattle Veterinary Association*, 23(Pt 1), 1-8.
 9. Bai, H., Sakurai, T., Fujiwara, H., Ideta, A., Aoyagi, Y., Godkin, J. D., & Imakawa, K. (2012). Functions of interferon tau as an immunological regulator for establishment of pregnancy. *Reproductive Medicine and Biology*, 11(3), 109-116. <https://doi.org/10.1007/s12522-011-0117-2>
 10. Baldassarre, H. (2021). Laparoscopic Ovum Pick-Up Followed by In Vitro Embryo Production and Transfer in Assisted Breeding Programs for Ruminants. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 11(1), 216. <https://doi.org/10.3390/ani11010216>
 11. Baldassarre, H., & Bordignon, V. (2018). Laparoscopic ovum pick-up for in vitro embryo production from dairy bovine and buffalo calves. *Animal Reproduction*, 15(3), 191-196. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0057>
 12. Baruselli, B. S., Batista, E. O. S., Viera, L. M., Ferreira, R. M., Guerreiro, B. G., Bayeux, B. M., Sales, J. N. S., Souza, A. H., & Gimenes, L. U. (2016). Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: Effects of different developmental & reproductive stages. *Periodikos*. <http://www.animal-reproduction.org/article/doi/10.21451/1984-3143-AR861>
 13. Basile, N., Elkhatib, I., & Meseguer, M. (2019). A Strength, Weaknesses, Opportunities and Threats analysis on time lapse. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 31(3), 148-155. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000534>
 14. Bazer, F. W. (2011). Uterine receptivity to implantation of blastocysts in mammals. *Frontiers in Bioscience*, S3(2), 745-767. <https://doi.org/10.2741/s184>
 15. Benne, J., Krisher, R., & Beaton, B. (2021). 71 Bovine embryonic development observed by time-lapse system. *Reproduction, Fertility and Development*, 34(2), 271-271. <https://doi.org/10.1071/RDv34n2Ab71>
 16. Blomberg, L., Hashizume, K., & Viebahn, C. (2008). Blastocyst elongation, trophoblastic differentiation, and embryonic pattern formation. *Reproduction (Cambridge, England)*,

- 135(2), 181-195. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0355>
17. Bó, G. A., Cedeño, A., & Mapletoft, R. J. (2019). Strategies to increment in vivo and in vitro embryo production and transfer in cattle. *Animal Reproduction*, 16(3), 411-422. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0042>
 18. Bo, G., & Mapletoft, R. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal reproduction*, 10, 344-348.
 19. Brown, W., Oliveira, M., Reis Silva, R., Woodruff, K., Bisha, B., Demetrio, D., & Block, J. (2024). Effects of mycobacterium cell wall fraction on embryo development following in vitro embryo production and pregnancy rates following embryo transfer in virgin dairy heifers. *Theriogenology*, 215, 334-342. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.12.019>
 20. Capalbo, A., Rienzi, L., Cimadomo, D., Maggiulli, R., Elliott, T., Wright, G., Nagy, Z. P., & Ubaldi, F. M. (2014). Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: An observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 29(6), 1173-1181. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu033>
 21. Cavazza, T., Takeda, Y., Politi, A. Z., Aushev, M., Aldag, P., Baker, C., Choudhary, M., Bucevičius, J., Lukinavičius, G., Elder, K., Blayney, M., Lucas-Hahn, A., Niemann, H., Herbert, M., & Schuh, M. (2021). Parental genome unification is highly error-prone in mammalian embryos. *Cell*, 184(11), 2860-2877.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.013>
 22. Ciftci, M. F., & Dinc, D. A. (2023). The effect of different FSH administration before ovum pick up on superstimulation response and oocyte yield. *Reproduction in Domestic Animals*, 58(8), 1055-1062. <https://doi.org/10.1111/rda.14394>
 23. Clemente, M., Lopez-Vidriero, I., O'Gaora, P., Mehta, J. P., Forde, N., Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., & Rizos, D. (2011). Transcriptome changes at the initiation of elongation in the bovine conceptus. *Biology of Reproduction*, 85(2), 285-295. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091587>
 24. Contreras, W. O. C., Alvis-Miranda, H. R., Gamarra, A. F., Rendon, B., Borda, D. A. V., Albicker, U., Fonoff, E. T., & Martinez-Diaz, M. (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. *Animal Reproduction Science*, 156, 58-63. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.02.009>
25. Cui, W., Marcho, C., Wang, Y., Degani, R., Golan, M., Tremblay, K. D., Rivera-Pérez, J. A., & Mager, J. (2019). MED20 is essential for early embryogenesis and regulates NANOG expression. *Animal Reproduction*, 157(3), 215-222. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0508>
 26. Da Silva, J. C. B., Ferreira, R. M., Maturana Filho, M., Naves, J. de R., Santin, T., Pugliesi, G., & Madureira, E. H. (2017). Use of FSH in two different regimens for ovarian superstimulation prior to ovum pick up and in vitro embryo production in Holstein cows. *Theriogenology*, 90, 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.016>
 27. Damayanti, E., Sonjaya, H., Hasbi, H., & Baco, S. (2020). Strategies to increase growth early embryo stages of bovine in achieving blastocysts in vitro: A Review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 492(1), 012082. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/492/1/012082>
 28. Díez Monforte, C., Muñoz Llamosas, M., Caamaño Gualdoni, J. N., & Gómez Piñeiro, E. (2013). Estado actual de los sistemas de producción de embriones en ganado bovino. *Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario*, 35-39.
 29. Dinnyés, A., Lonergan, P., Fair, T., Boland, M. P., & Yang, X. (1999). Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of in vitro-produced bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*, 53(3), 318-324. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199907\)53:3<318::AID-MRD7>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199907)53:3<318::AID-MRD7>3.0.CO;2-O)
 30. Dirvanauskas, D., Maskeliunas, R., Raudonis, V., & Damasevicius, R. (2019). Embryo development stage prediction algorithm for automated time lapse incubators. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 177, 161-174. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2019.05.027>
 31. Do, V. H., Catt, S., Amaya, G., Batsiokis, M., Walton, S., & Taylor-Robinson, A. W. (2018). Comparison of pregnancy in cattle when non-vitrified and vitrified in vitro-derived embryos are transferred into recipients. *Theriogenology*, 120, 105-110. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.07.027>

32. Echtenkamp, S., & Elliott, D. (1988). A Simple Method for Freezing Bovine Embryos. *Roman L. Hruska U.S. Meat Animal Research Center: Reports*. <https://digitalcommons.unl.edu/hruskareports/70>
33. Erdem, H., Karasahin, T., Alkan, H., Dursun, S., Satilmis, F., & Guler, M. (2020a). Effect of embryo quality and developmental stages on pregnancy rate during fresh embryo transfer in beef heifers. *Tropical Animal Health and Production*, 52(5), 2541-2547. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02287-6>
34. Erdem, H., Karasahin, T., Alkan, H., Dursun, S., Satilmis, F., & Guler, M. (2020b). Effect of embryo quality and developmental stages on pregnancy rate during fresh embryo transfer in beef heifers. *Tropical Animal Health and Production*, 52(5), 2541-2547. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02287-6>
35. Esmailvand, M., Abedelahi, A., Hamdi, K., Farzadi, L., Goharitaban, S., Fattahi, A., & Niknafs, B. (2022). Role of miRNAs in preimplantation embryo development and their potential as embryo selection biomarkers. *Reproduction, Fertility, and Development*, 34(8), 589-597. <https://doi.org/10.1071/RD21274>
36. Fadon, P., Gallegos, E., Jalota, S., Muriel, L., & Diaz-Garcia, C. (2021). Time-Lapse Systems: A Comprehensive Analysis on Effectiveness. *Seminars in Reproductive Medicine*, 39(5-06), e12-e18. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1742149>
37. Fayezi, S., Leroy, J. L. M. R., Novin, M. G., & Darabi, M. (2018). Oleic acid in the modulation of oocyte and preimplantation embryo development. *Zygote*, 26(1), 1-13. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000582>
38. Ferraz, P. A., Burnley, C., Karanja, J., Viera-Neto, A., Santos, J. E. P., Chebel, R. C., & Galvão, K. N. (2016). Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. *Theriogenology*, 86(7), 1834-1841. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.032>
39. Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020a). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991-1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
40. Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J.

- (2020b). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991-1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
41. Feugang, J. M., Camargo-Rodríguez, O., & Memili, E. (2009). Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science*, 121(2), 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.06.019>
 42. Findikli, N., & Oral, E. (2014). Time-lapse embryo imaging technology: Does it improve the clinical results? *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 26(3). <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000072>
 43. Fry, R. C., Niall, E. M., Simpson, T. L., Squires, T. J., & Reynolds, J. (1997). The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*, 47(5), 977-987. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00054-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00054-X)
 44. Fujii, T., Moriyasu, S., Hirayama, H., Hashizume, T., & Sawai, K. (2010). Aberrant expression patterns of genes involved in segregation of inner cell mass and trophectoderm lineages in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Cellular Reprogramming*, 12(5), 617-625. <https://doi.org/10.1089/cell.2010.0017>
 45. Gallego, F., Mancheno, A., Mena, L., & Murillo, A. (2022). Bovine in vitro Embryo Production: State of the Art. *ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of S.T.E.A.M.*, 172-185. <https://doi.org/10.18502/epoch.v2i2.11192>
 46. Gomes, T., Romualdo, R., & Ernandes, L. (2019). Effect of semen and donor factors on multiple ovulation and embryo transfer (MOET) in sheep. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 54(2). <https://doi.org/10.1111/rda.13381>
 47. Graf, A., Krebs, S., Heininen-Brown, M., Zakhartchenko, V., Blum, H., & Wolf, E. (2014). Genome activation in bovine embryos: Review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Animal Reproduction Science*, 149(1), 46-58. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.05.016>
 48. Gutierrez-Reinoso, M. A., Cabezas, J., Rodriguez, N., Sandoval-Lagos, N., Castro, F., García-Herreros, M., & Rodriguez-Alvarez, L. (2022, junio 26). *Evaluation of two approaches for in vivo oocyte collection and in vitro embryo production in holstein cow and heifers.*
 49. Hartshorne, G. M., & Edwards, R. G. (1991). 9 Role of embryonic factors in implantation:

- Recent developments. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 5(1), 133-158.
[https://doi.org/10.1016/S0950-3552\(05\)80075-6](https://doi.org/10.1016/S0950-3552(05)80075-6)
50. Hasler, Bilby, C. R., Collier, R. J., Denham, S. C., & Lucy, M. C. (2003). Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology*, 59(9), 1919-1928.
[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01295-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01295-5)
51. Hasler, Henderson, W. B., Hurtgen, P. J., Jin, Z. Q., McCauley, A. D., Mower, S. A., Neely, B., Shuey, L. S., Stokes, J. E., & Trimmer, S. A. (1995). Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43(1), 141-152.
[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)00020-U](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)00020-U)
52. Hasler, J. (2004). *Factors influencing the success of embryo transfer in cattle*.
53. Hayakawa, H., Hirai, T., Takimoto, A., Ideta, A., & Aoyagi, Y. (2009). Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology*, 71(1), 68-73.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.016>
54. Hayden, C. B., Sala, R. V., Absalón-Medina, V. A., Motta, J. C. L., Pereira, D., Moreno, J. F., & García-Guerra, A. (2022). Synchronization of follicle wave emergence before ovarian superstimulation with FSH and ovum pick-up improves in vitro embryo production in pregnant heifers. *Theriogenology*, 188, 71-78.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.05.017>
55. Hernández-Cerón, J., & Gutierrez-Aguilar, C. G. (2013). La somatotropina bovina recombinante y la reproducción en bovinos, ovinos y caprinos. *Agrociencia*, 47(1), 35-45.
56. Herrero, J., & Meseguer, M. (2013). Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: The era of morphokinetics. *Fertility and Sterility*, 99(4), 1030-1034.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.089>
57. Hirayama, H., Moriyasu, S., Kageyama, S., Sawai, K., Takahashi, H., Geshi, M., Fujii, T., Koyama, T., Koyama, K., Miyamoto, A., Matsui, M., & Minamihashi, A. (2014). Enhancement of maternal recognition of pregnancy with parthenogenetic embryos in bovine embryo transfer. *Theriogenology*, 81(8), 1108-1115.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.039>
58. Hoelker, M., Held, E., Salilew-Wondim, D., Schellander, K., & Tesfaye, D. (2013).

- Molecular signatures of bovine embryo developmental competence. *Reproduction, Fertility, and Development*, 26(1), 22-36. <https://doi.org/10.1071/RD13255>
59. Huayhua C, Rodríguez M, Vega J, Briones M, Rodríguez-Alvarez L, Mellisho E. (2023) Blastulation time measured with time-lapse system can predict in vitro viability of bovine blastocysts. *PLoS One*. 18(8), doi: 10.1371/journal.pone.0289751. PMID: 37561791; PMCID: PMC10414680.
 60. Hue, I., Degrelle, S. A., Champion, E., & Renard, J. P. (2007). Gene expression in elongating and gastrulating embryos from ruminants. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 64, 365-377. <https://doi.org/10.5661/rdr-vi-365>
 61. IETS. (2021). Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 39(4), 54pp.
 62. Johnson, M. H., & Ziomek, C. A. (1981). The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell*, 24(1), 71-80. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90502-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90502-X)
 63. Jorge Neto, P. N., Requena, L., Pizzutto, C., & Baldassarre, H. (2018). *Laparoscopic Ovum Pick-Up (LOPU): From animal production to conservation*. 8, 61-67. <https://doi.org/10.18548/aspe/0006.07>
 64. Jousan, F. D., de Castro e Paula, L. A., Block, J., & Hansen, P. J. (2007). Fertility of Lactating Dairy Cows Administered Recombinant Bovine Somatotropin During Heat Stress. *Journal of Dairy Science*, 90(1), 341-351. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72635-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72635-8)
 65. Jukam, D., Shariati, S. A. M., & Skotheim, J. M. (2017). Zygotic Genome Activation in Vertebrates. *Developmental Cell*, 42(4), 316-332. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.07.026>
 66. Kaser, D. J., & Racowsky, C. (2014). Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: A systematic review. *Human Reproduction Update*, 20(5), 617-631. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu023>
 67. Kieslinger, D. C., De Gheselle, S., Lambalk, C. B., De Sutter, P., Kosteljik, E. H., Twisk, J. W. R., van Rijswijk, J., Van den Abbeel, E., & Vergouw, C. G. (2016). Embryo selection using time-lapse analysis (Early Embryo Viability Assessment) in conjunction with standard morphology: A prospective two-center pilot study. *Human Reproduction (Oxford*,

- England*), 31(11), 2450-2457. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew207>
68. Kim, D., & Yi, J. (2023). Improving Cryopreservation Efficiency and Pregnancy Rate through Superovulation with Follicle-Stimulating Hormone in Korean Hanwoo Cows via Ovum Pick Up. *Veterinary Sciences*, 10(9), 578. <https://doi.org/10.3390/vetsci10090578>
 69. Kirkegaard, K., Ahlström, A., Ingerslev, H. J., & Hardarson, T. (2015). Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertility and Sterility*, 103(2), 323-332. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.003>
 70. Kowalczyk, A., Czerniawska-Piątkowska, E., & Wrzecińska, M. (2021). The Importance of Interferon-Tau in the Diagnosis of Pregnancy. *BioMed Research International*, 2021, 9915814. <https://doi.org/10.1155/2021/9915814>
 71. Kussano, N. R., Leme, L. O., Guimarães, A. L. S., Franco, M. M., & Dode, M. a. N. (2016). Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. *Theriogenology*, 85(6), 1167-1176. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.033>
 72. Lacerda, I. P. de, Dode, M. A. N., Lima, M. M. S., Guerra, B. F., Costa, E. S., Moreira, G. R., & Carvalho, J. de O. (2020). Cattle breed affects in vitro embryo production in a large-scale commercial program on dairy farms. *Livestock Science*, 240, 104135. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104135>
 73. Latham, K. E., & Schultz, R. M. (2001). Embryonic genome activation. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 6, D748-759. <https://doi.org/10.2741/latham>
 74. Lechniak, D., Pers-Kamczyc, E., & Pawlak, P. (2008). Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. *Reproductive Biology*, 8(1), 23-42. [https://doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60002-3](https://doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60002-3)
 75. Lewis, N., Schnauffer, K., Hinrichs, K., Morganti, M., Troup, S., & Argo, C. (2019). Morphokinetics of early equine embryo development in vitro using time-lapse imaging, and use in selecting blastocysts for transfer. *Reproduction, Fertility, and Development*, 31(12), 1851-1861. <https://doi.org/10.1071/RD19225>
 76. Lonergan, P., Khatir, H., Piumi, F., Rieger, D., Humblot, P., & Boland, M. P. (1999). Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117(1), 159-167. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1170159>

77. Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F., & Boland, M. P. (2001). Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction, Nutrition, Development*, 41(5), 427-437. <https://doi.org/10.1051/rnd:2001142>
78. Machaty, Z., Miller, A. R., & Zhang, L. (2017). Egg Activation at Fertilization. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 953, 1-47. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46095-6_1
79. Machaty, Z., Peippo, J., & Peter, A. (2012). Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. *Theriogenology*, 78(5), 937-950. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.003>
80. Magata, F. (2023). Time-lapse monitoring technologies for the selection of bovine in vitro fertilized embryos with high implantation potential. *The Journal of Reproduction and Development*, 69(2), 57-64. <https://doi.org/10.1262/jrd.2022-131>
81. Magata, F., Ideta, A., Okubo, H., Matsuda, F., Urakawa, M., & Oono, Y. (2019). Growth potential of bovine embryos presenting abnormal cleavage observed through time lapse cinematography. *Theriogenology*, 133, 119-124. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.04.031>
82. Manjunatha, B. M., Gupta, P. S. P., Ravindra, J. P., Devaraj, M., & Nandi, S. (2008). In vitro embryo development and blastocyst hatching rates following vitrification of river buffalo embryos produced from oocytes recovered from slaughterhouse ovaries or live animals by ovum pick-up. *Animal Reproduction Science*, 104(2), 419-426. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.06.030>
83. Masuda, Y., Hasebe, R., Kuromi, Y., Kobayashi, M., Urataki, K., Hishinuma, M., Ohbayashi, T., & Nishimura, R. (2021). Three-Dimensional Live Imaging of Bovine Preimplantation Embryos: A New Method for IVF Embryo Evaluation. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 639249. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.639249>
84. Meirelles, F. V., Caetano, A. R., Watanabe, Y. F., Ripamonte, P., Carambula, S. F., Merighe, G. K., & Garcia, S. M. (2004). Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.012>
85. Merton, J. S., de Roos, A. P. W., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P. L. a. M., &

- Dieleman, S. J. (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)
86. Mikkola, M., Hasler, J. F., & Taponen, J. (2019). Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. *Reproduction, Fertility, and Development*, *32*(2), 104-124. <https://doi.org/10.1071/RD19279>
87. Moreira, F., Badinga, L., Burnley, C., & Thatcher, W. W. (2002). Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*, *57*(4), 1371-1387. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00719-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00719-1)
88. Morera-Jiménez, A., Velasco-García, E., Herás, S., Romero-Aguirregomezcorta, J., & Ruiz, S. (2022). Respuesta a la estimulación ovárica mediante fsh (folltropin®) y rendimiento de opu en vacas adultas obtenidas por diferentes técnicas de reproducción asistida. *Anales de Veterinaria de Murcia*, *36*. <https://doi.org/10.6018/analesvet.538651>
89. Mucci, N., Aller, J. F., Kaiser, G. G., Hozbor, F., & Alberio, R. H. (2006). Producción in vitro de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de medicina veterinaria*, *38*(2), 97-104. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2006000200002>
90. Negrón-Pérez, V. M., & Hansen, P. J. (2017). The bovine embryo hatches from the zona pellucida through either the embryonic or abembryonic pole. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *34*(6), 725-731. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-0933-3>
91. Nel-Themaat, L., & Nagy, Z. P. (2011). A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. *Placenta*, *32* Suppl 3, S257-263. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.05.011>
92. Niimura, S., Ogata, T., Okimura, A., Sato, T., Uchiyama, Y., Seta, T., Nakagawa, H., Nakagawa, K., & Tamura, Y. (2010). Time-Lapse Videomicrographic Observations of Blastocyst Hatching in Cattle. *Journal of Reproduction and Development*, *56*(6), 649-654. <https://doi.org/10.1262/jrd.10-069H>
93. Nõmm, M., Porosk, R., Pärn, P., Kilk, K., Soomets, U., Kõks, S., & Jaakma, Ü. (2019). In vitro culture and non-invasive metabolic profiling of single bovine embryos. *Reproduction*,

- Fertility, and Development*, 31(2), 306-314. <https://doi.org/10.1071/RD17446>
94. Nowicki, A. (2021). Embryo Transfer as an Option to Improve Fertility in Repeat Breeder Dairy Cows. *Journal of Veterinary Research*, 65(2), 231-237. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2021-0018>
 95. Ongaratto, F. L., Cedeño, A. V., Rodríguez-Villamil, P., Tríbulo, A., & Bó, G. A. (2020). Effect of FSH treatment on cumulus oocyte complex recovery by ovum pick up and in vitro embryo production in beef donor cows. *Animal Reproduction Science*, 214, 106274. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106274>
 96. Orozco-Lucero, E., & Sirard, M.-A. (2014). Molecular markers of fertility in cattle oocytes and embryos: Progress and challenges. *Animal reproduction*, 11(3), 183-194.
 97. Ozawa, M., Sakatani, M., Yao, J., Shanker, S., Yu, F., Yamashita, R., Wakabayashi, S., Nakai, K., Dobbs, K. B., Sudano, M. J., Farmerie, W. G., & Hansen, P. J. (2012). Global gene expression of the inner cell mass and trophectoderm of the bovine blastocyst. *BMC Developmental Biology*, 12(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-12-33>
 98. Pinto, C. (2022). *Embryo Transfer in Cattle*. MSD Veterinary Manual. <https://www.msddvetmanual.com/management-and-nutrition/embryo-transfer-in-farm-animals/embryo-transfer-in-cattle>
 99. Pontes, J. H. F., Nonato-Junior, I., Sanches, B. V., Ereno-Junior, J. C., Uvo, S., Barreiros, T. R. R., Oliveira, J. A., Hasler, J. F., & Seneda, M. M. (2009). Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, 71(4), 690-697. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.031>
 100. Pujol, M., López-Béjar, M., & Paramio, M.-T. (2004). Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*, 61(4), 735-744. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00250-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00250-4)
 101. Quispe E, C., Ancco G, E., Solano A, J., Unchupaico P, I., & Mellisho S, E. (2018). Capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos de bovino recuperados vía ultrasonografía y de ovarios de matadero. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(4), 1114-1121. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.14418>
 102. Quispe, C., Fernandez, E., Ancco, E., Oriundo, K., & Mellisho, E. (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(1), 59-62. <https://doi.org/10.18548/aspe/0002.13>
103. Rabel, R. A. C., Marchioretto, P. V., Bangert, E. A., Wilson, K., Milner, D. J., & Wheeler, M. B. (2023). Pre-Implantation Bovine Embryo Evaluation-From Optics to Omics and Beyond. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 13(13), 2102. <https://doi.org/10.3390/ani13132102>
 104. Ramos-Ibeas, P., Gimeno, I., Cañón-Beltrán, K., Gutiérrez-Adán, A., Rizos, D., & Gómez, E. (2020). Senescence and Apoptosis During in vitro Embryo Development in a Bovine Model. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 619902. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.619902>
 105. Rasmussen, S., Block, J., Seidel, G. E., Brink, Z., McSweeney, K., Farin, P. W., Bonilla, L., & Hansen, P. J. (2013). Pregnancy rates of lactating cows after transfer of in vitro produced embryos using X-sorted sperm. *Theriogenology*, 79(3), 453-461. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.017>
 106. Rizos, D., Clemente, M., Bermejo-Alvarez, P., de La Fuente, J., Lonergan, P., & Gutiérrez-Adán, A. (2008). Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 43 Suppl 4, 44-50. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x>
 107. Rocha, J. C., Passalia, F., Matos, F. D., Maserati Jr, M. P., Alves, M. F., de Almeida, T. G., Cardoso, B. L., Basso, A. C., & Nogueira, M. F. G. (2016). Methods for assessing the quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard? *JBRA Assisted Reproduction*, 20(3), 150-158. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20160033>
 108. Rodriguez-Osorio, N., Dogan, S., & Memili, E. (2012). Epigenetics of Mammalian Gamete and Embryo Development. En *Livestock Epigenetics* (pp. 3-25). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119949930.ch1>
 109. Sánchez, J. M., Mathew, D. J., Passaro, C., Fair, T., & Lonergan, P. (2018). Embryonic maternal interaction in cattle and its relationship with fertility. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 53 Suppl 2, 20-27. <https://doi.org/10.1111/rda.13297>
 110. Saraswathy, N., & Ramalingam, P. (2011). 6—Genome mapping. En N. Saraswathy & P.

- Ramalingam (Eds.), *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics* (pp. 77-93). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781908818058.77>
111. Sasamoto, Y., Sakaguchi, M., Katagiri, S., Yamada, Y., & Takahashi, Y. (2003). The effects of twisting and type of aspiration needle on the efficiency of transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in cattle. *The Journal of Veterinary Medical Science*, *65*(10), 1083-1086. <https://doi.org/10.1292/jvms.65.1083>
 112. Sawai, K. (2021). Roles of cell differentiation factors in preimplantation development of domestic animals. *The Journal of Reproduction and Development*, *67*(3), 161-165. <https://doi.org/10.1262/jrd.2021-031>
 113. Sayid, A. (2021). Advances in Bovine Follicular Aspiration Technique. *World Scientific News*, *157*(null), 169-188.
 114. Schmoll, F., Schneider, H., Montag, M., Wimmers, K., Rink, K., & Schellander, K. (2003). Effects of different laser-drilled openings in the zona pellucida on hatching of in vitro-produced cattle blastocysts. *Fertility and Sterility*, *80*, 714-719. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(03\)00989-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(03)00989-0)
 115. Schulz, K. N., & Harrison, M. M. (2019). Mechanisms regulating zygotic genome activation. *Nature Reviews Genetics*, *20*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0087-x>
 116. Sciorio, R., & Meseguer, M. (2021). Focus on time-lapse analysis: Blastocyst collapse and morphometric assessment as new features of embryo viability. *Reproductive Biomedicine Online*, *43*(5), 821-832. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.08.008>
 117. Seshagiri, P. B., Vani, V., & Madhulika, P. (2016). Cytokines and Blastocyst Hatching. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, *75*(3), 208-217. <https://doi.org/10.1111/aji.12464>
 118. Shafei, R. A., Syrkasheva, A. G., Romanov, A. Y., Makarova, N. P., Dolgushina, N. V., & Semenova, M. L. (2017). [Blastocyst Hatching in Humans]. *Ontogenez*, *48*(1), 8-20.
 119. Shapiro, B. S., Daneshmand, S. T., Garner, F. C., Aguirre, M., & Thomas, S. (2008). Large blastocyst diameter, early blastulation, and low preovulatory serum progesterone are dominant predictors of clinical pregnancy in fresh autologous cycles. *Fertility and Sterility*, *90*(2), 302-309. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.06.062>

120. Silva, T., Santos, E. C., Annes, K., Soares, C. A., Leite, R. F., Lima, C. B., & Milazzotto, M. P. (2016). Morphokinetic-related response to stress in individually cultured bovine embryos. *Theriogenology*, 86(5), 1308-1317. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.072>
121. Simintiras, C. A., Sánchez, J. M., McDonald, M., O'Callaghan, E., Aburima, A. A., & Lonergan, P. (2021). Conceptus metabolomic profiling reveals stage-specific phenotypes leading up to pregnancy recognition in cattle†. *Biology of Reproduction*, 104(5), 1022-1033. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab021>
122. Sirard, M.-A., & Coenen, K. (2006). In Vitro Maturation and Embryo Production in Cattle. En P. J. Verma & A. O. Trounson (Eds.), *Nuclear Transfer Protocols: Cell Reprogramming and Transgenesis* (pp. 35-42). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-154-3_2
123. Sirard, M.-A., Richard, F., Blondin, P., & Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65(1), 126-136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.020>
124. Sofi, khursheed ahmad, & Singh, M. (2018). *Laparoscopy as a Diagnostic Tool in Bovine Reproduction: A Review*. <https://doi.org/10.17140/VMOJ-3-127>
125. Somfai, T., Inaba, Y., Aikawa, Y., Ohtake, M., Kobayashi, S., Konishi, K., & Imai, K. (2010). Relationship between the length of cell cycles, cleavage pattern and developmental competence in bovine embryos generated by in vitro fertilization or parthenogenesis. *The Journal of Reproduction and Development*, 56(2), 200-207. <https://doi.org/10.1262/jrd.09-097a>
126. Speckhart, S. L., Oliver, M. A., & Ealy, A. D. (2023). Developmental Hurdles That Can Compromise Pregnancy during the First Month of Gestation in Cattle. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 13(11), 1760. <https://doi.org/10.3390/ani13111760>
127. Spencer, T. E. (2013). Early pregnancy: Concepts, challenges, and potential solutions. *Animal Frontiers*, 3(4), 48-55. <https://doi.org/10.2527/af.2013-0033>
128. Srinivas, S., & Rodriguez, T. A. (2017). A Tale of Division and Polarization in the Mammalian Embryo. *Developmental Cell*, 40(3), 215-216. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.01.008>

129. Starbuck, M. J., Inskip, E. K., & Dailey, R. A. (2006). Effect of a single growth hormone (rbST) treatment at breeding on conception rates and pregnancy retention in dairy and beef cattle. *Animal Reproduction Science*, 93(3-4), 349-359. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.08.010>
130. Stringfellow, D. A., & Givens, M. D. (2010). *Manual of the International Embryo Transfer Society: A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures* (4th ed). International Embryo Transfer Society.
131. Sturmeijer, R. G., Bermejo-Alvarez, P., Gutierrez-Adan, A., Rizados, D., Leese, H. J., & Lonergan, P. (2010). Amino acid metabolism of bovine blastocysts: A biomarker of sex and viability. *Molecular Reproduction and Development*, 77(3), 285-296. <https://doi.org/10.1002/mrd.21145>
132. Sugimura, S., Akai, T., & Imai, K. (2017). Selection of viable in vitro-fertilized bovine embryos using time-lapse monitoring in microwell culture dishes. *The Journal of Reproduction and Development*, 63(4), 353-357. <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-041>
133. Tadros, W., & Lipshitz, H. D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: A play in two acts. *Development*, 136(18), 3033-3042. <https://doi.org/10.1242/dev.033183>
134. Tríbulo, P., Rivera, R. M., Ortega Obando, M. S., Jannaman, E. A., & Hansen, P. J. (2019). Production and Culture of the Bovine Embryo. En J. R. Herrick (Ed.), *Comparative Embryo Culture: Methods and Protocols* (pp. 115-129). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9566-0_8
135. Vajta, G., Holm, P., Greve, T., & Callesen, H. (1997). Survival and development of bovine blastocysts produced in vitro after assisted hatching, vitrification and in-straw direct rehydration. *Reproduction*, 111(1), 65-70. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1110065>
136. Valadão, L., Silva, H. M. da, & Silva, F. M. da. (2018). Bovine Embryonic Development to Implantation. En *Embryology—Theory and Practice*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80655>
137. Van den Abbeel, E., Balaban, B., Ziebe, S., Lundin, K., Cuesta, M. J. G., Klein, B. M., Helmggaard, L., & Arce, J.-C. (2013). Association between blastocyst morphology and outcome of single-blastocyst transfer. *Reproductive Biomedicine Online*, 27(4), 353-361.

- <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.07.006>
138. Van Soom, A., Mateusen, B., Leroy, J., & De Kruif, A. (2003). Assessment of mammalian embryo quality: What can we learn from embryo morphology? *Reproductive Biomedicine Online*, 7(6), 664-670. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)62089-5](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)62089-5)
 139. Vandaele, L., Mateusen, B., Maes, D., de Kruif, A., & Van Soom, A. (2006). Is apoptosis in bovine in vitro produced embryos related to early developmental kinetics and in vivo bull fertility? *Theriogenology*, 65(9), 1691-1703. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.014>
 140. Vieira, L. M., Rodrigues, C. A., Castro Netto, A., Guerreiro, B. M., Silveira, C. R. A., Moreira, R. J. C., Sá Filho, M. F., Bó, G. A., Mapletoft, R. J., & Baruselli, P. S. (2014). Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve in vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology*, 82(2), 318-324. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.013>
 141. Wamaita, S. E., & Niakan, K. K. (2018). Chapter Twelve—Human Pre-gastrulation Development. En B. Plusa & A.-K. Hadjantonakis (Eds.), *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 128, pp. 295-338). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.11.004>
 142. Ward, F., Rizos, D., Corridan, D., Quinn, K., Boland, M., & Lonergan, P. (2001). Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Molecular Reproduction and Development*, 60(1), 47-55. <https://doi.org/10.1002/mrd.1060>
 143. Wolf, E., Arnold, G., Bauersachs, S., Beier, H., Blum, H., Einspanier, R., Fröhlich, T., Herrler, A., Hiendleder, S., Kölle, S., Prella, K., Reichenbach, H.-D., Stojkovic, M., Wenigerkind, H., & Sinowatz, F. (2003). Embryo-Maternal Communication in Bovine – Strategies for Deciphering a Complex Cross-Talk. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(4), 276-289. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00435.x>
 144. Wooldridge, L. K., Keane, J. A., Rhoads, M. L., & Ealy, A. D. (2022). Bioactive supplements influencing bovine in vitro embryo development. *Journal of Animal Science*, 100(7), skac091. <https://doi.org/10.1093/jas/skac091>
 145. Yaacobi-Artzi, S., Kalo, D., & Roth, Z. (2022). Association between the morphokinetics of

- in-vitro-derived bovine embryos and the transcriptomic profile of the derived blastocysts. *PLOS ONE*, 17(10), e0276642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276642>
146. Yao, T., Suzuki, R., Furuta, N., Suzuki, Y., Kabe, K., Tokoro, M., Sugawara, A., Yajima, A., Nagasawa, T., Matoba, S., Yamagata, K., & Sugimura, S. (2018). Live-cell imaging of nuclear–chromosomal dynamics in bovine in vitro fertilised embryos. *Scientific Reports*, 8, 7460. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25698-w>
147. Zangirolamo, A. F., Morotti, F., da Silva, N. C., Sanches, T. K., & Seneda, M. M. (2018). Ovarian antral follicle populations and embryo production in cattle. *Animal Reproduction*, 15(3), 310-315. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0072>
148. Zhang, J. Q., Li, X. L., Peng, Y., Guo, X., Heng, B. C., & Tong, G. Q. (2010). Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. *Reproductive Biomedicine Online*, 20(4), 510-515. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.12.027>