

Research Article

# Bovine *in vitro* Embryo Production: State of the Art

## Producción de Embriones Bovinos *in vitro*: Estado del Arte

F. Gallegos<sup>1</sup>, A. Mancheno<sup>2</sup>, L. Mena<sup>3</sup>, and A. Murillo<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>TADEC (Técnicos Agropecuarios del Ecuador), Gerencia en Ventas, Ambato, Ecuador

<sup>2</sup>Carrera de Zootecnia, Facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador

<sup>3</sup>Carrera de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador

### ORCID

A. Murillo: 0000-0002-2276-6643

II CONGRESO  
INTERNACIONAL DE  
PRODUCCIÓN PECUARIA Y  
AGROINDUSTRIAL ESPOCH  
2021 (II CEPPEA 2021)

Corresponding Author: A.  
Murillo; email:  
antonio.murillo@epoch.  
edu.ec

Published: 14 June 2022

Production and Hosting by  
Knowledge E

© F. Gallegos et al. This  
article is distributed under the  
terms of the [Creative  
Commons Attribution  
License](#), which permits  
unrestricted use and  
redistribution provided that  
the original author and  
source are credited.

### Abstract

In the last 10 years, bovine *in vitro* embryo production has shown significant progress on a global level, partly driven by a better understanding of technology potential in the livestock sector. Importantly, in 2016, the number of viable bovine embryos produced *in vitro* exceeded the number of transferable embryos derived *in vivo* (multiple ovulation embryo transfer, MOET). *In vitro* embryo production (PIVE) requires the correct formulation of culture media to allow the development of oocytes and embryos. In cattle, the PIVE process includes three sequential processes *in vitro*: maturation of oocytes, fertilization of matured oocytes, and culture of fertilized oocytes to obtain embryo development of blastocyst. *In vitro*-produced blastocysts can be transferred fresh to synchronized recipients or be cryopreserved (vitrified or frozen) for later transfer or commercialization. These assisted reproduction techniques have demonstrated acceptable outcomes in livestock, helping technicians and farmers to improve reproductive performance, production efficiency, and genetic progress.

**Keywords:** bovine, *in vitro*, embryo, reproduction, technology.

### Resumen

En los últimos 10 años, la producción de embriones bovinos *in vitro* ha mostrado un progreso significativo a escala mundial, en parte impulsado por una mejor comprensión del potencial de esta tecnología en el sector ganadero. Es importante destacar que en 2016, el número de embriones bovinos viables producidos *in vitro* superó al número de embriones transferibles producidos *in vivo* (transferencia de embriones de ovulación múltiple, MOET). La producción *in vitro* de embriones (PIVE) requiere la formulación correcta de medios de cultivo que permitan el desarrollo de ovocitos y embriones. En bovinos, el proceso de PIVE incluye tres procesos secuenciales *in vitro*: la maduración de ovocitos, la fecundación de los ovocitos madurados y el cultivo de cigotos hasta alcanzar el desarrollo embrionario de blastocisto. Los blastocistos producidos *in vitro* pueden ser transferidos en fresco a receptoras sincronizadas o pueden ser criopreservados (vitrificados o congelados) para su posterior transferencia o comercialización. Estas técnicas de reproducción asistida han sido probadas con éxito en el campo comercial, ayudando a técnicos y productores de ganado bovino a mejorar el desempeño reproductivo, la eficiencia productiva y la mejora genética.

**Palabras Clave:** bovino, *in vitro*, embrión, reproducción, tecnología.

 OPEN ACCESS



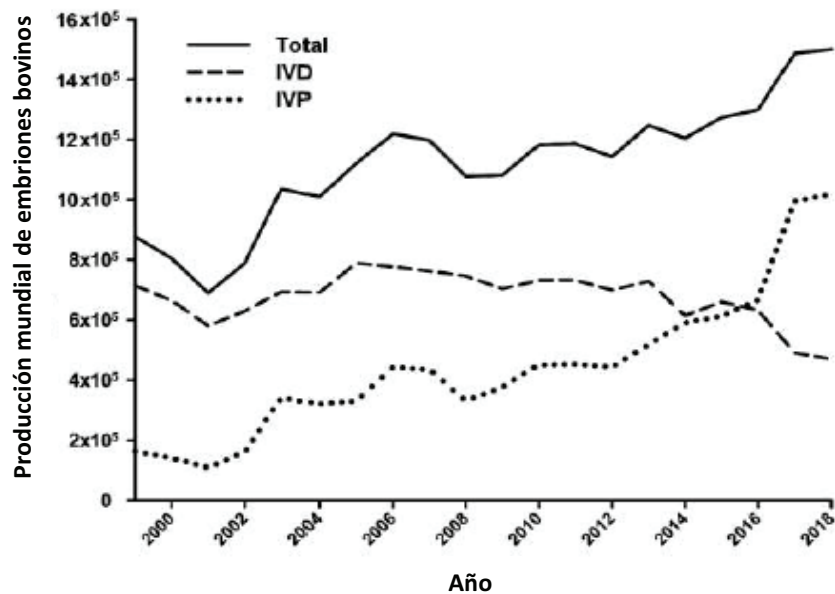
## 1. Introducción

Los avances científicos y tecnológicos logrados durante las últimas décadas en la reproducción animal han resultado en el desarrollo de una variedad de herramientas comúnmente denominadas como tecnologías de reproducción asistida. El objetivo primario de estas herramientas es maximizar el número de prole de animales genéticamente superiores y diseminar su germoplasma por todo el mundo.

Las tecnologías de la reproducción asistida más comunes actualmente en el sector bovino mundial son la transferencia de embriones de ovulación múltiple (MOET) y la producción *in vitro* de embriones (PIVE). Los programas MOET han permitido incrementar la intensidad de selección y reducir el intervalo generacional, acelerando el progreso genético en los programas de selección. Sin embargo, desde su invención y perfeccionamiento de la técnica, el rendimiento no ha mejorado significativamente, ya que el número de embriones transferibles obtenidos (6,5 embriones) por donante se ha mantenido casi invariable (1). Otras desventajas incluyen una elevada variabilidad de la respuesta a los tratamientos hormonales de estimulación ovárica (aproximadamente un 20% de las donantes no producen embriones), un amplio periodo de reposo entre cada tratamiento y la falta de resultados eficientes con el uso de semen sexado (2) Hasler, 2003; (3) Mikkola y cols., 2017).

En la última década, la producción de embriones bovinos *in vitro* se ha incrementado significativamente a escala mundial, en parte impulsado por una mejor comprensión del potencial de esta tecnología en el sector ganadero (4). La combinación de la producción *in vitro* de embriones con semen sexado y la selección genómica se está utilizando ampliamente con éxito en América del Norte, América del Sur y Europa. Según datos reportados en 2019 por la International Embryo Technology Society (IETS) (1), el número de embriones producidos *in vitro* ha aumentado de manera ininterrumpida desde 2012, a una tasa promedio del 15,8% anual. Es importante destacar que en 2016 se superó el número de embriones viables de producción *in vitro* frente al número de embriones transferibles derivados *in vivo* (Fig. 1). Esta tendencia muestra un cambio entre los productores que utilizan MOET tradicional, hacia el uso de PIVE.

A finales de la década de los noventa, la cantidad de embriones congelados-descongelados (tanto derivados *in vivo* como producidos *in vitro*) transferidos fue prácticamente similar a los embriones frescos (no criopreservados). Posteriormente, la proporción de embriones frescos producidos *in vitro* transferidos se ha incrementado. Sin embargo, a partir de 2014 ha existido un aumento en el número de transferencias de embriones producidos *in vitro* congelados-descongelados (1), debido a la mejora en el diseño y preparación de medios de cultivo sin (o con bajo) contenido de suero



**Figure 1**

Número de embriones bovinos (derivados *in vivo*-IVD, producidos *in vitro*-IVP y Total) registrados en el periodo 1999-2018, por la International Embryo Technology Society (IETS) (1).

bovino (5) y/o con aditivos embriotróficos específicos que promueven la calidad de los embriones.

Una de las estrategias para producir embriones *in vitro* de mejor calidad, es intentar simular el ambiente y los procesos del desarrollo embrionario temprano que ocurren en el trato reproductivo de la hembra bovina. Los embriones bovinos *in vitro* pueden ser producidos a partir de ovocitos obtenidos mediante aspiración folicular guiada por ultrasonido de donadoras vivas (Ovum Pick-Up, OPU) (6), o de hembras sacrificadas mediante la punción de folículos en ovarios obtenidos en el matadero (7).

La producción de embriones bovinos en laboratorio requiere de tres procesos secuenciales *in vitro*: la maduración de ovocitos, la fecundación espermática de los ovocitos madurados y el cultivo de presuntos cigotos hasta que logren alcanzar los estadios de blastocisto. En cada fase del proceso de producción de embriones *in vitro*, las condiciones físicas y químicas de los medios utilizados deben ser controladas estrictamente para permitir la maduración de ovocitos, la capacitación e interacción de los gametos y el desarrollo embrionario correcto.

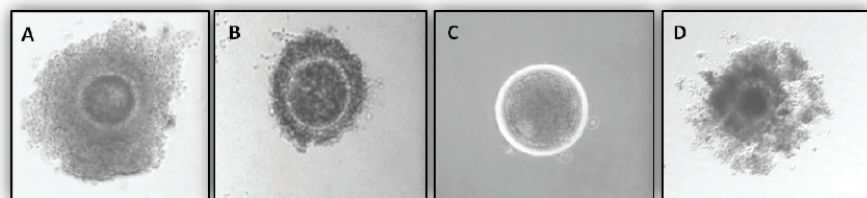
Según varios estudios realizados en mamíferos, la calidad de los embriones bovinos producidos *in vitro* está relacionada directamente con las condiciones del cultivo, durante el desarrollo embrionario de cigoto a blastocisto (8, 9, 10). Además, el cultivo

post fecundación, incide también en la salud y desarrollo del feto, el parto y la salud del ternero (9, 11). En la actualidad, la calidad de los embriones bovinos producidos *in vitro* aún no es similar a los embriones derivados *in vivo*. Por lo tanto, es necesario mejorar los sistemas de producción *in vitro* de embriones, no solo para producir un mayor número de blastocitos, sino, blastocistos de mejor viabilidad capaces de producir gestaciones a término y una progenie saludable.

El objetivo de la presente revisión es describir el proceso, las dificultades y los avances realizados en la producción *in vitro* de embriones bovinos.

## 1.1. Recuperación de ovocitos

En bovinos, los ovocitos para producción *in vitro* de embriones se obtienen de vacas y novillas mediante dos técnicas: a) aspiración folicular guiada por ultrasonido (OPU) de animales vivos; b) aspiración folicular post mortem (derivada de ovarios de matadero). En los dos procedimientos, los ovocitos se aspiran de un grupo heterogéneo de folículos antrales, de 3 a 8 mm de tamaño, dominantes y subordinados de diferentes ondas foliculares, tanto ovulatorias como no ovulatorias. Los ovocitos aspirados son seleccionados en la práctica de rutina únicamente por su morfología. De esta manera, solo los ovocitos que están rodeados por lo menos de una o más capas de células del cumulus y que presentan un citoplasma homogéneo se escogen para la maduración *in vitro* (Fig. 2).



**Figure 2**

*Clasificación de ovocitos bovinos recuperados de ovarios antes del proceso de maduración in vitro. A: ovocito con más de tres capas de células del cumulus, B: ovocito con una a tres capas de células del cumulus, C: ovocito sin células del cumulus, D: ovocito con células del cumulus expandidas. Adaptado de (4).*

En el caso de la técnica OPU (12), es posible obtener de cuatro a cinco (grados 1 y 2) (13) ovocitos utilizables por sesión de donantes no estimuladas Bos Taurus (14), mientras que la estimulación con FSH puede aumentar la tasa de recuperación de ovocitos hasta 20 por sesión de donante Holstein (15). Las hembras Bos indicus generalmente



producen más ovocitos por aspiración folicular sin sincronización ni estimulación hormonal en comparación con *Bos Taurus* ( $15,1 \pm 1,9$  v.  $7,8 \pm 0,8$ , respectivamente) (16). Sin embargo, es importante destacar que hay casos notificados de *Bos indicus* en el que la estimulación de FSH antes de OPU también ha resultado en efectos positivos sobre la PIV y las tasas de gestación resultantes (17).

Varios enfoques han sido sugeridos para mejorar el número de folículos y la calidad de ovocitos (medida como la tasa de embriones viables) en los programas OPU. Las estrategias incluyen: a) estimulación del donante con gonadotropinas (18), b) pre-maduración parcial *in vivo*, denominada "coasting" (19) y c) suplementación dietética con concentrados energéticos ricos en ácidos grasos (20).

## 1.2. Maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos

La maduración del núcleo y del citoplasma de los ovocitos es fundamental para la fecundación y el desarrollo embrionario posterior. La maduración nuclear consiste en la reactivación de la meiosis desde la profase I (en la primera división meiótica) a la metafase II (en la segunda división meiótica), hasta el momento de la ovulación. La maduración citoplasmática consiste en la reorganización de orgánulos (21) y la acumulación de ARNm, proteínas, sustratos y nutrientes (22). La meiosis se detiene en MII hasta el momento de la fecundación, momento en el cual se reanuda y completa la generación del segundo corpúsculo polar (23).

Varios estudios han evidenciado que ciertos factores como el origen de los ovocitos (OPU o matadero), y el tamaño de los folículos, así como la raza, la edad, el estado nutricional y la salud de las donantes influyen en la calidad *in vitro* de los ovocitos bovinos (24, 25). La fuente heterogénea de ovocitos inmaduros extraídos de folículos ováricos en diferentes fases del crecimiento folicular puede comprometer la competencia del desarrollo embrionario debido a una finalización inadecuada de la maduración citoplasmática del ovocito (26). Alrededor del 85% al 90% de los ovocitos inmaduros cultivados alcanzarán la metafase II al final de la MIV en condiciones adecuadas (27).

## 1.3. Fecundación *in vitro* (FIV)

Después de completar la MIV, los ovocitos y espermatozoides pasan por un periodo de coincubación durante un máximo de 18 a 24 h durante la FIV. El semen bovino congelado debe ser descongelado, seleccionado y capacitado antes de la FIV. Los métodos de selección de semen se usan para eliminar el diluyente espermático,



el plasma seminal y los espermatozoides muertos, logrando separar así los espermatozoides vivos y móviles. En la práctica rutinaria en general, se usan dos métodos para la separación de espermatozoides: el método "swim-up" fundamentado en las características de motilidad espermática (28) y el método de gradiente discontinuo fundamentado en las diferentes densidades de los espermatozoides vivos y muertos (29).

Los espermatozoides además deben tratarse con agentes de capacitación (por ejemplo: heparina, penicilamina, hipotaurina y epinefrina) para poder atravesar la zona pelúcida del ovocito (28). Generalmente una concentración de 1 a 2 millones de espermatozoides por ml se usa para el proceso de FIV, aunque el número mínimo de espermatozoides requeridos por ovocito no se ha estandarizado debido a la variación que existe entre toros y razas (30).

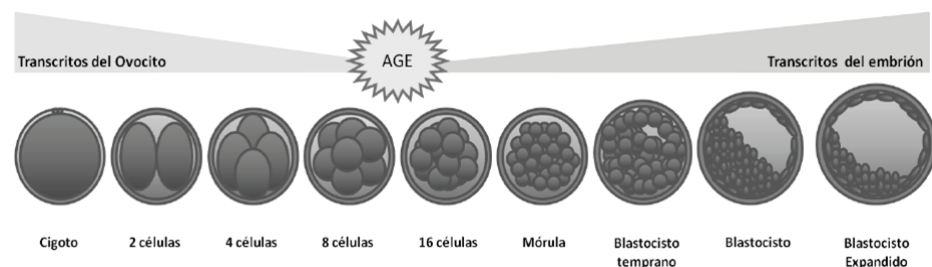
La tasa de fecundación se mide valorando la tasa de segmentación a las 48 h post-inseminación, y varía entre el 70% y el 85%. La mayor ventaja de la FIV es que requiere una pequeña cantidad de espermatozoides para fecundar los ovocitos recolectados, lo cual tiene especial repercusión en el uso y aprovechamiento de semen sexado, ya sea mediante sexado tradicional (semen fresco sexado previo al empaquetado y congelación) o sexado inverso (semen congelado-descongelado, sexado y usado en FIV) (31). La viabilidad del semen sexado inverso se demostró cuando fue utilizado en un programa de PIVE a gran escala (32). Este avance tecnológico permitió la producción *in vitro* de embriones sexados a partir de las mejores hembras con los mejores toros en cuanto a mérito genético.

#### 1.4. Cultivo *in vitro* (CIV)

El CIV de embriones bovinos implica mantener el desarrollo embrionario desde el estadio de cigoto hasta los estadios de blastocisto, durante aproximadamente 7 días. Al inicio del desarrollo embrionario temprano los transcritos de ARN maternos y las proteínas producidas y almacenadas durante la ovogénesis son las encargadas de regular el proceso (33). El cigoto se transforma en un embrión multicelular mediante divisiones mitóticas sucesivas en proceso llamado segmentación. Cada célula generada por segmentación se denomina blastómero y su tamaño disminuye conforme avanza la división celular, sin afectar el tamaño del embrión hasta el estadio de blastocisto. Al comienzo de la embriogénesis los blastómeros son totipotentes, lo que significa que pueden convertirse en cualquier tipo de célula fetal o adulta. Los transcritos de ARN y proteínas maternas se degradan progresivamente mientras los transcritos propios

del embrión comienzan a sintetizarse una vez que se produce la transición materno-embriónica (4).

La transición materno-embriónica implica la activación del genoma embrionario (AGE; 33). En bovino, durante los estadios de 8 a 16 células se completa la AGE. La transcripción del genoma embrionario después de la transición materno-embriónica es ampliamente dinámico y controla el proceso de compactación de la mórula y el posterior desarrollo del blastocisto (34). El blastocisto está formado por el trofocotodermo, una masa celular interna y el blastocelo (líquido). La parte fetal de la placenta y las membranas embrionarias accesorias se forman a partir de las células del trofocotodermo. Las células de la masa celular interna son pluripotentes y producirán todos los tejidos embrionarios y una parte de las membranas embrionarias accesorias (35). Mientras el blastocelo gana espacio, el tamaño del embrión se incrementa y la zona pelúcida reduce su grosor (Fig. 3).



**Figure 3**

*Desarrollo embrionario bovino. AGE: activación del genoma embrionario. Adaptado de (4).*

Se han desarrollado diferentes sistemas de CIV con el fin de imitar las condiciones fisiológicas *in vivo* de los embriones bovinos. En bovinos, los medios de cultivo utilizados para PIVE son comúnmente una mezcla de sustancias como: agua, sales, fuentes de energía, macromoléculas, aminoácidos, sustancias tampón y antioxidantes (4).

En bovino, el medio más común en el proceso de CIV de embriones es el medio sintético de fluido de oviducto (SOF) (36). Con frecuencia, el medio SOF se suplementa con aminoácidos esenciales y no esenciales, citrato, mioinositol (37) y fuentes de proteína como suero fetal bovino (FBS) o albúmina sérica bovina (BSA).

Se ha demostrado que el FBS tiene un efecto sobre el desarrollo embrionario que es dependiente de los estadios. Así, actúa como inhibidor del desarrollo los primeros estadios embrionarios y estimulante del desarrollo de mórulas y blastocistos (38-41). Sin embargo, existe evidencia que el FBS puede ser perjudicial para el desarrollo *in vitro* de embriones, ya que disminuye la calidad embrionaria (42). La presencia de FBS en el cultivo embrionario modifica los orgánulos celulares, degrada las mitocondrias, altera



la expresión génica, aumenta el contenido de lípidos y reduce la supervivencia a la criopreservación (43-46). Además, cuando los embriones son transferidos a receptoras los riesgos de alteraciones fetales, distocias y problemas perinatales se incrementan con el uso de FBS durante el CIV (47, 48).

Actualmente, las formulaciones de medios de cultivo intentan reducir al mínimo las cantidades de suero o suprimirlas totalmente con el uso de sustitutos sintéticos, lo cual puede dar como resultado tasas y calidad de blastocistos similares o incluso más altas en comparación con los que incluyen suero (5, 49, 50). Además, se ha puesto un mayor enfoque en las restricciones reglamentarias relativas a la importación/exportación de embriones cultivados en medios que contienen suero animal, debido al riesgo de propagación de patógenos, por lo que ha aumentado la tendencia de excluir el suero de los medios de cultivo. Aunque el uso comercial de embriones *in vitro* se ha incrementado en todo el mundo, aún existe la necesidad de mejorar tanto el rendimiento como la calidad de estos, con el fin de obtener mejores tasas de supervivencia a la criopreservación y aumentar los porcentajes de gestación mediante transferencia directa a receptoras sincronizadas, que minimicen las pérdidas embrionarias, problemas al parto y se obtenga progenie saludable.

### 1.5. Criopreservación de embriones producidos *in vitro*

La criopreservación es un proceso en el cual los embriones alcanzan temperaturas muy bajas, lo que ayuda a minimizar la actividad fisiológica de cada célula embrionaria para que se preserven vivos durante amplios periodos de tiempo. En bovinos, la criopreservación de embriones ayuda a disminuir los gastos en las ganaderías, evita la necesidad de la actividad reproductiva cíclica y permite optimizar recursos cuando existen excedentes de embriones o déficit de hembras receptoras. De igual manera, la criopreservación simplifica la gestión y el uso de embriones para incrementar la variabilidad genética y limitar la deriva genética, facilita la creación de bancos de recursos genéticos de razas en peligro de extinción, promueve la comercialización mundial de embriones y elimina patologías asociadas al manejo de animales vivos.

Después de alcanzar la etapa de blastocisto, los embriones *in vitro* pueden ser y transferidos en fresco (técnica similar a los embriones *in vivo*) o pueden ser criopreservados. Sin embargo, se recomienda únicamente criopreservar embriones *in vitro* de alta calidad, con el fin de lograr una mayor viabilidad post-descongelación, lo cual puede aumentar las tasas de gestación en el caso de protocolos de transferencia directa de embriones.





La técnica de criopreservación utilizada predominantemente para los embriones producidos *in vitro* es la vitrificación (51) debido a su simplicidad, rapidez y bajo costo. Sin embargo, esta técnica utiliza altas concentraciones de crioprotectores y requiere un laboratorio y personal capacitado para evaluar los embriones antes de la transferencia (52), lo que restringe el uso de esta técnica a gran escala. Por otro lado, la congelación lenta de embriones para su posterior transferencia directa, a pesar de tener costos operativos ligeramente más altos, es más práctica porque elimina la evaluación morfológica antes de la transferencia. Además, permite utilizar concentraciones inferiores de crioprotectores, lo cual reduce la toxicidad para los embriones (53).

Las nuevas tendencias señalan que, al seleccionar una mejor calidad de embriones, se incrementa su viabilidad y son capaces de tolerar el proceso de congelación lenta para transferencia directa, equiparando las tasas de gestación a las obtenidas con embriones *in vitro* transferidos en fresco o vitrificados (50, 54).

## 2. Conclusiones

La evolución de la industria mundial de embriones bovinos *in vitro* para los próximos años es positiva. El incremento en el uso de la tecnología de producción *in vitro* de embriones ha tenido repercusión en diferentes aspectos de la actividad de transferencias embrionarias, como la comercialización mundial, la especialización del sector ganadero y técnicos pecuarios, el uso de semen sexado, la criopreservación, la selección genómica, entre otras. Los avances en la recuperación de ovocitos, cultivo, criopreservación y el entorno de laboratorio han hecho posible el incremento en el uso de la producción de embriones *in vitro* para la obtención de millones de animales de alto valor genético a escala mundial. Aunque el número de embriones producidos *in vitro* ha superado ampliamente a los embriones derivados *in vivo*, es una tecnología que aún puede perfeccionarse si se logra comprender mejor el desarrollo embrionario temprano.

## 3. Agradecimientos

A la facultad de ciencias pecuarias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por la invaluable labor en busca fortalecer la investigación científica en el Ecuador.

## 4. Conflicto de Intereses

No existe ningún conflicto de interés.



## References

- [1] Viana J. 2018 statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. In Embryo Technology Newsletter. 2019;36(4): 8-25: [http://www.iets.org/comm\\_data.asp](http://www.iets.org/comm_data.asp) .
- [2] Hasler JF. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Science*. 2003;79:245-64.
- [3] Mikkola M, Taponen J. Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Folltropin or Pluset. *Theriogenology*. 2017;88:84-88.
- [4] Ríos AV. Sistema de cultivo para mejorar la viabilidad de embriones bovinos producidos in vitro [Doctoral dissertation]. Universitat Politècnica de València, España; 2018.
- [5] Murillo A, Muñoz M, Martín-Gonzalez D, Carrocera S, Martínez-Nistal A, Gomez E. Low serum concentration in bovine embryo culture enhances early blastocyst rates on Day-6 with quality traits in the expanded blastocyst stage similar to BSA-cultured embryos. *Reproductive biology* 2017;17(2):162e71.
- [6] Merton JS, de Roos AP, Mollaart E et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*. 2003;59:651-674
- [7] Galli C, Duchi R, Crotti G, et al. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*. 2003;59:599-616.
- [8] Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-Garcia R, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biology of reproduction* 2002. 66:589–595.
- [9] Fleming TP, Velázquez MA, Eckert JJ. Embryos, DOHaD and David Barker. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 2015;6(5):377–383.
- [10] Hansen PJ. Developmental programming in the preimplantation period: can it be exploited to enhance postnatal function in cattle?. *Animal Reproduction*. 2015;12:428-436.
- [11] Duranthon V, Chavatte-Palmer P. Long term effects of ART: What do animals tell us? *Molecular Reproduction and Development* 2018;85(4):348-368.
- [12] Bols PE, Leroy JLMR, Viana JHM. Technical and biological aspects of ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval in the cow: an overview. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2005;(1)103–108.



- [13] de Loos F, van Vliet C, van Maurik P, Kruip TA. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research*. 1989;24:197–204.
- [14] Hasler JF. The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the Bovine. *Journal of Animal Science*. 1998;76:52–74.
- [15] Vieira LM, Rodrigues CA, Netto A et al. Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior to ovum pick-up in Holstein cattle. *Theriogenology*. 2016;85:877–886.
- [16] Fernandes CAC, Miyauchi TM, Figueiredo ACS et al. Hormonal protocols for in vitro production of Zebu and taurine embryos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2014;49:813–817.
- [17] Cavalieri FLB, Morotti F, Seneda MM et al. Improvement of bovine in vitro embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology*. 2017;117:57–60.
- [18] Sendag S, Cetin Y, Alan M, Hadelar K-G, Niemann H. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. *Animal Reproduction Science*. 2008;106:208–214.
- [19] Nivet AL, Bunel A, Labrecque R et al. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction*. 2012;143:165–171.
- [20] Dunning KR, Russell DL, Robker RL. Lipids and oocyte developmental competence: The role of fatty acids and  $\beta$ -oxidation. *Reproduction*. 2014;148:R15–R27.
- [21] Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 2009;71(5):836-48.
- [22] Watson AJ. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of Animal Science*. 2007;85(13):E1–E3.
- [23] Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*. 2001;55:1241–1254.
- [24] Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science*. 2004;82–83:431–446.
- [25] Luciano AM, Sirard MA. Successful in vitro maturation of oocytes: A matter of follicular differentiation. *Biology of reproduction*. 2018;98(2):162-169.
- [26] Mermillod P, Oussaid B and Cognie Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1999;54:449–460.



- [27] Mermillod P, Locatelli Y, Dalbies-Tran R et al. In vitro production of ruminant embryos: results, limits and perspectives. Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture; Tainan, Taiwan. December, 2006
- [28] Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 1986;25(4):591-600.
- [29] Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge ML, First NL. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biology of reproduction*. 1991;44:256-260.
- [30] Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M and Lonergan P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*. 2002;57:2105–2117.
- [31] de Graaf SP, Evans G, Maxwell WM, Cran DG and O'Brien JK. Birth of offspring of pre-determined sex after artificial insemination of frozen-thawed, sex sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, 2007;67:391–398.
- [32] Morotti F, Sanches BV, Pontes JHF et al. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology*. 2014;81:696-701.
- [33] Graf A, Krebs S, Heininen-Brown M et al. Genome activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Animal Reproduction Science*. 2014;149:46-58.
- [34] Rodriguez-Zas SL, Schellander K, Lewin HA. Biological interpretations of transcriptional profiles in mammalian oocytes and embryos. *Reproduction*. 2008;135(2):129-139.
- [35] Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: Clues from mouse models. *Nature Reviews Genetics*. 2006;7:185-99.
- [36] Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1972;30:493–497.
- [37] Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*. 1999;52:683–700.
- [38] Pinyopummintr T, Bavister BD. Development of bovine embryos in a cell-free medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology*. 1994;41:1241–9.



- [39] Thompson JG, Sherman ANM, Allen NW, McGowan LT, Tervit HR. Total protein content and protein synthesis within pre-elongation stage bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 1998;50(2):139-145.
- [40] Gómez E, Diez C. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development in vitro. *Animal Reproduction Science*. 2000;58:23-37.
- [41] Holm P, Booth PJ, Callesen H. Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo-and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction*. 2002;123:553–65.
- [42] Heras S, De Coninck DI, Van Poucke M et al. Suboptimal culture conditions induce more deviations in gene expression in male than female bovine blastocysts. *BMC genomics*. 2016;17(1):72.
- [43] Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular reproduction and development* 2002;61(1):57-66.
- [44] Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implication for blastocysts development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of reproduction*. 2003;68:236–43.
- [45] Gómez E, Rodríguez A, Muñoz M et al. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology*. 2008;69(8):1013-1021.
- [46] Sudano MJ, Paschoal DM, Rascado TS et al. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*. 2011;75:1211– 20.
- [47] Farin PW, Crosier AE, Farin CE. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*. 2001;55(1):151-170.
- [48] Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D et al. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology of reproduction*. 2002;67:767–75.
- [49] Stroebech L, Mazzoni G, Pedersen HS et al. In vitro production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. *Animal Reproduction*. 2015;12:465–472.
- [50] Sanches BV, Lunardelli PA, Tannura JH et al. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology*. 2016;85:1147–1151.



- [51] Dode MAN, Leme LO, Spricigo JFW. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em periódico indexado 2013;37:145-50.
- [52] Vajta G, Holm P, Kuwayama M et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and 336 embryos. Molecular reproduction and development. 1998;51:53–8.
- [53] Voelkel SA, Hu YX. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology. 1992;37:23-37.
- [54] Gómez E, Carrocera S, Martín D et al. Efficient one-step direct transfer to recipients of thawed bovine embryos cultured in vitro and frozen in chemically defined medium. Theriogenology. 2020;146:39-47.