

TÉCNICAS IN VIVO E IN VITRO SOBRE CALIDAD Y VIABILIDAD DE EMBRIONES EN BOVINOS

IN VIVO AND IN VITRO TECHNIQUES ON QUALITY AND VIABILITY OF EMBRYOS IN BOVINE

Denisse Maryeli Loor Loor^{1*}

¹ Carrera de Medicina Veterinaria, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Calceta, Ecuador. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-5078-0786>. Correo: denisse.loor@espam.edu.ec

Jorge Ignacio Macias Andrade²

² Carrera de Medicina Veterinaria, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Calceta, Ecuador. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1774-719X>. Correo: jmacias@espam.edu.ec

* Autor para correspondencia: denisse.loor@espam.edu.ec

Resumen

En las últimas décadas, la producción de embriones in vivo e in vitro han revolucionado la ganadería, lo que permitió obtener avances de mejoramiento genético, que, en efecto, dichas técnicas se llevaron a cabo en otras especies zootécnicas. Ambas técnicas son fundamentales para evaluar la calidad y viabilidad de embriones en bovinos, la técnica in vivo, se da en cuatro fases en el tracto reproductivo de la vaca, las cuales son; superestimulación, inseminación, desarrollo, recolección. A diferencia de la técnica in vivo, en la producción in vitro se recolectan los ovocitos de la vaca, posterior a ello, requiere de instalaciones de laboratorio para llevar a cabo la maduración, fertilización y cultivo. El presente artículo tiene sustentó teórico de las diversas bases de datos científicas, así como la gestión y selección de los documentos clave. Se espera que los resultados de esta investigación proporcionen información sólida sobre las diferencias de la técnica de producción de embriones in vivo e in vitro en bovinos y de esta manera, permitan conocer las ventajas y desventajas de las biotecnologías en los programas de reproducción asistida.

Palabras clave: Reproducción; Biotecnología; Ganado; Mejoramiento genético.

Abstract

In the last decades, the production of embryos in vivo and in vitro have revolutionized cattle breeding, which allowed to obtain advances in genetic improvement, which, in fact, these techniques were carried out in other zootechnical species. Both techniques are fundamental to evaluate the quality and viability of embryos in

cattle. The in vivo technique is carried out in four phases in the reproductive tract of the cow, which are: super-stimulation, insemination, development and collection. Unlike the in vivo technique, in the in vitro production, the oocytes are collected from the cow, after which laboratory facilities are required to carry out maturation, fertilization and culture. This article has theoretical support from the various scientific databases, as well as the management and selection of key documents. It is expected that the results of this research will provide solid information on the differences between in vivo and in vitro embryo production techniques in bovines and, in this way, will allow knowing the advantages and disadvantages of biotechnologies in assisted reproduction programs.

Keywords: *Reproduction; Biotechnology; Cattle; Genetic improvement.*

Fecha de recibido: 20/11/2024

Fecha de aceptado: 07/01/2025

Fecha de publicado: 17/01/2025

Introducción

En el transcurso del tiempo, se han desarrollado diversas biotecnologías reproductivas haciendo uso de las mismas en el ganado vacuno. Siendo la inseminación artificial (IA) en los años cuarenta la que revolucionó la ganadería lo que permitió obtener avances en el mejoramiento genético que, en efecto, se amplió a otras especies zootécnicas. Estas biotecnologías se definen en cuatro generaciones, donde la transferencia de embriones in vitro es la tercera y no menos importante seguida de la Inseminación artificial (IA), finalmente la transferencia nuclear y la transgénesis (Thibier, 2005).

En relación a la producción de embriones (Garza et al., 2023) afirma que existen dos tipos de técnicas utilizadas, la técnica in vivo, que se da por un proceso natural y se producen dentro del tracto reproductivo de la vaca mediante el apareamiento o inseminación artificial. Aunque el proceso sea natural, existe menos control sobre factores como la calidad del óvulo y la eficacia de la fertilización (Hayden et al., 2023). A diferencia de la técnica in vivo, Goicochea et al., (2021) menciona que la fecundación in vitro (FIV) emplea medios de cultivos enriquecidos, que proveen un ambiente simulado al ovocito maduro y a los espermatozoides.

Un estudio realizado por Salgado y Lopera (2020) revelan que la técnica de producción in vitro de embriones bovinos (PIVE), además de consolidarse como una de las técnicas de reproducción asistida más exitosa en las últimas décadas, ha permitido el desarrollo de variantes técnicas, abriendo la posibilidad de utilizarse con fines de investigación (desarrollo embrionario temprano, transgénesis y clonación). Pese a ello, es necesario tener en cuenta que esta técnica se acerca a la realidad in vivo, sin embargo, se necesita mejorar la técnica ya que no hay un medio de cultivo como el útero de la vaca.

Además, Rodríguez y Gutiérrez (2023) consideran que los embriones producidos in vitro son menos competentes que los embriones generados in vivo. Un estudio demostró que el origen embrionario (in vivo versus in vitro) y su etapa de desarrollo (blastulación y eclosión) tienen un efecto sobre las características poblacionales (tamaño promedio, concentración y contenido de pequeñas moléculas de ARN) de vesículas

extracelulares secretadas por embriones bovinos. Por tanto, (Somfai & Hirao, 2021) mencionan que una mayor secreción de vesículas extracelulares y un mayor número de pequeñas moléculas de ARN diferencialmente expresados podrían estar relacionados con la competencia embrionaria.

La industria de producción de embriones bovinos ha experimentado un crecimiento significativo en las últimas dos décadas, particularmente en la producción de embriones producidos in vitro. “Este crecimiento, impulsado por los avances en criopreservación, medios de cultivo in vitro, procedimientos de recolección de óvulos (OPU), dispositivos de ultrasonografía y transferencia de embriones (ET) ha sido notable” (Silva et al., 2024). Y según Santana et al., (2022) la expansión del uso de técnicas de producción in vitro ha revolucionado el mercado de embriones bovinos.

En este enfoque, las biotécnicas reproductivas han adquirido una importancia cada vez mayor y ofrecen la posibilidad de realizar avances significativos en materia de ganancia genética y producción ganadera (Valente et al., 2024). Por ello, el indagar sobre la producción de embriones es vital para la productividad del ganado. Hassaneen et al., (2023) afirma que las mejoras en el desarrollo embrionario de alta calidad producido tanto in vitro como in vivo tendrían un gran impacto en la productividad bovina. A pesar de su potencial prometedor, la técnica aún enfrenta limitaciones que dificultan su adopción generalizada (Dellaqua et al., 2023).

El objetivo de esta investigación, pretende describir las diferencias de la técnica de producción de embriones in vivo e in vitro en bovinos.

Materiales y métodos

Los autores realizaron una investigación sistemática para localizar los documentos bibliográficos, incluyendo bases de datos como Scopus, Springer y Science direct, así como motores de búsqueda en línea como Dialnet, Redalyc.org, Science direct y Google Académico. Se utilizó una estrategia de búsqueda específica con descriptores como "escritura científica", "revisiones de producción de embriones en bovinos", "técnicas " e " in vivo e in vitro ".

Los documentos clave fueron analizados críticamente y categorizados según su relevancia para respaldar el artículo. Se implementó un sistema de categorización para organizar la información de manera estructurada y facilitar la síntesis de resultados. La búsqueda bibliográfica se centró en investigaciones desde el año 2020, con el objetivo de revisar de manera sistemática las técnicas utilizadas en la producción de embriones, diferencias entre la técnica in vivo e in vitro y sus ventajas y desventajas.

Resultados y discusión

El presente estudio tuvo como objetivo describir las técnicas in vivo e in vitro sobre la calidad y viabilidad del embrión en bovinos. Un estudio previo llevado a cabo por Banliat et al. (2022) indican que la producción de embriones de manera in vivo e in vitro de los ovocitos es un aspecto importante para determinar la tasa del

desarrollo embrionario. Layek et al. (2022) afirma que tanto embriones in vitro como los in vivo se criopreservan y transfieren de la misma manera, pero la diferencia radica en el método de producción.

La primera etapa en la producción in vitro se lleva a cabo a través de aspiración de ovocitos guiada por ecografía transvaginal, la aspiración folicular transvaginal o la extracción de óvulos (OPU), técnica que, aunque sea poco invasiva y se pueda lograr con o sin estimulación; la calidad del ovocito se ve comprometida principalmente en función al número de capas de células del cúmulo (Sable et al., 2024). En la segunda fase que corresponde a la maduración, tanto los inicios de dicha tecnología como en los últimos años los medios de cultivos han evolucionado, sin embargo, hoy en día en su mayoría contienen suero bovino fetal, los cuales se basan en una solución salina equilibrada, soluciones de aminoácidos, piruvato y se complementan con vitaminas, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y tampones de iones metálicos (Sciorio et al., 2024).

En un estudio llevado a cabo por Layek et al. (2022) explica que después de la maduración, los ovocitos se incuban con los espermatozoides por 18 a 24 horas, siendo así, los espermatozoides deben pasar por una serie de procesos que toma el nombre de capacitación espermática, esto, desestabiliza la membrana del espermatozoide lo que permite la unión a la zona pelúcida del ovocito logrando la reacción acrosómica, a su vez la penetración y fertilización del óvulo. Posterior a eso, 24 horas después de la fertilización se separan las células de cúmulo y de los espermatozoides adheridos a través de un medio de lavado, finalmente los blastocitos se ubican en medios de cultivo compuestos por medios de cultivos, aminoácidos y suero fetal bovino hasta el día 7 que estaría listo para transferir en una receptora.

Además, Leite da Silva et al. (2020) afirma que la diferencia principal de la producción in vivo, es que el proceso se lleva a cabo en el tracto reproductivo de la vaca, con la técnica de superovulación, misma que también ha sido fundamental para la recolección de embriones, consiste en la estimulación de los ovarios a través de la hormona folículo estimulante (FSH) que induce a la ovulación múltiple, en dosis varían entre 18 y 40mg estarán divididas en 2 aplicaciones diarias por 4 días. Posterior a ello, se ejecuta la inseminación artificial en doble dosis para asegurar la fertilización de los óvulos liberados. El lavado de embriones se ejecuta después de la compactación, blastulación y durante la expansión en preferencia el día 7 después de la inseminación artificial mediante lavado uterino transcervical, misma que comprende, la colección, evaluación y posterior introducción del embrión dentro del tracto reproductivo de la hembra.

Consecuentemente, (Padovani et al., 2024) menciona que en el lavado de embriones se utiliza una sonda flexible con balón inflable que se introduce con un mandril, a través de la vagina, cervix y cuerpo uterino hasta uno de los cuernos. Con el extremo de la sonda en la curvatura mayor del cuerno uterino se retira el mandril de 8 a 10 cm, avanzando con cuidado la sonda en dirección craneal, se infla el balón con 10 a 20 ml de aire. Con el medio de cultivo en fracciones de 30 a 50 ml que fluyen, tras retirar la jeringuilla de la sonda. A través del medio se masajea el cuerno uterino así los embriones localizados en criptas o pliegues son arrastrados por la corriente del medio hacia el exterior. Al finalizar el lavado de uno de los cuernos se infunde de nuevo de 20 a 50 ml de medio levantando el extremo craneal del cuerno para posibilitar el reflujó del último resto del líquido acumulado. En total se estima necesario un litro de medio de lavado para ambos cuernos, aunque 250 ml por cuerno en vacas y en 180 ml novillas son suficientes. El medio resultante se mantiene a temperatura ambiente hasta el aislamiento de los embriones, debiéndose evitar oscilaciones de

temperatura. Las tasas de recuperación de embriones mejoran cuando la sonda de lavado se coloca anterior a la bifurcación uterina en lugar de la punta del cuerno uterino.

Actualmente, también se ha estudiado el efecto de la raza tanto bos Taurus como bos Indicus sobre la calidad embrionaria. En una investigación llevada a cabo por (Wohlfres et al., 2011) indica que los embriones producidos in vitro utilizando ovocitos Brahman (*B. indicus*) con semen Angus (*B. taurus*) fueron más termotolerantes que embriones producidos por inseminación con ovocitos Holstein con semen Angus (*B. taurus*). Pero, no hubo diferencia ($P > 0,05$) en la tasa de segmentación [67,8% (78/115) vs. 56,7% (101/178), para Gyr y Holstein, respectivamente], sin embargo, la tasa de blastocistos fue mayor para Gyr que para Holstein [27,0% (31/115) vs. 16,3% (29/178), $P < 0,05$, respectivamente]. En la producción de embriones in vivo, no hubo diferencia ($P > 0,05$) en el número medio de óvulos recuperados ($5,8 \pm 1,7$ vs. $10,7 \pm 1,8$).

El estudio realizado por, Leite da Silva et al. (2020) demuestra que existen diferencias significativas y evidentes en la transcripción de la expresión de la proteína. Esta diferencia de expresión proteica podría estar asociada con el desarrollo de la competencia ovocitaria y la adaptación para el ambiente tropical de las vacas *B. indicus*, a diferencia de las *B. taurus*, debido a que mientras mayor sea la expresión de esta proteína, mayor es la resistencia al estrés calórico. Estas biotecnologías reproductivas pueden utilizarse para explotar los ovocitos y genotipos para producir animales híbridos cuyos gametos presenten mayor capacidad de maduración y desarrollo en ambientes tropicales (Sciorio et al., 2024).

Entre las similitudes en los métodos de producción, tales como, el diámetro en diferentes etapas de crecimiento, no hay distinción en las tasas de fertilización, el método de escisión es similar, no hay diferencia en el número de embriones totales, el número de embriones que tienen más de 16 células, el número de embriones transferibles, así mismo, no hay diferencias en las técnicas de transferencia (Borges et al., 2020). Por otra parte, Layek et al. (2022) menciona que algunas diferencias morfológicas son; una tonalidad más oscura, menos compactos, tienen un número de células comparablemente menor, una zona pelúcida frágil y una baja relación entre la masa celular interna y el trofooctodermo. Además, Sable et al. (2024) revela que los embriones in vitro son más frágiles al choque criogénico ya que se ven afectados por una sensibilidad al estrés oxidativo, causada por la acumulación de anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, especies reactivas de oxígeno (ROS) y peróxidos lipídicos. Acosta et al., (2024) afirma que todo lo antes mencionado tiene efectos adversos en el desarrollo de los embriones, y tienen una viabilidad comparativamente reducida después de la congelación.

La comparación de los embriones bovinos desarrollados in vitro o in vivo explica diferencias en la morfología, ultraestructura, perfiles lipídicos y metabolismo energético. Además, la transcriptómica comparada de embriones bovinos desarrollados in vitro han informado diferencias en la expresión genética y patrones de metilación, revelando mecanismos moleculares subyacentes a la mayor capacidad de desarrollo de los embriones desarrollados in vivo (Sciorio et al., 2024). Por otro lado, estudios como la suplementación con resveratrol en bovino producidos de manera in vitro reafirma que la maduración nuclear es más rápida ya que se protege a las células de los efectos adversos del estrés oxidativo y, en consecuencia, mejora la viabilidad y la criotolerancia al minimizar los contenidos de ROS en los ovocitos y embriones de ganado (Padovani et al., 2024).

De acuerdo con Banliat et al. (2022) es de gran relevancia mencionar que en el ganado, el número de embriones producidos in vitro que se transfieren en todo el mundo está creciendo continuamente y ha superado el de los embriones producidos in vivo desde 2016. La tasa de preñez es entre un 10 y un 15% menor en el caso de embriones producidos in vitro en comparación con la obtenida mediante embriones in vivo (Allcca et al., 2023). Erdem et al. (2020) reporta que el coste de producir embriones in vitro es mucho menor que el de los embriones in vivo, por lo que los embriones in vitro están disponibles a precios mucho más económicos, y a su vez, su disponibilidad en el mercado internacional es comparativamente mayor. Sin embargo, Lee et al. (2020) recalca que, cuando se utilizan embriones in vitro, nacen terneros con sobrepeso grave o con anomalías congénitas; ya que, varios microorganismos están vinculados, pero, con protocolos modificados y medidas de bioseguridad, los riesgos de transmisión de enfermedades se reducen a proporciones insignificantes.

A manera de comparación Leite da Silva et al. (2020) expresa algunas ventajas y desventajas tales como; los tipos de donantes ya que van a influir en la producción de embriones en la técnica in vivo es recomendable solo novillas, y vacas cíclicas mientras que en la forma in vitro se utilizan novillas, vacas cíclicas, preñadas tempranas, donantes viejas. Así mismo se pueden lograr mayores procedimientos al año a través de la técnica in vitro con un número de 20 a 25 y 6 a 8 procesos por el método in vivo. También el uso clasificado de sexo para obtener embriones del sexo deseado es recomendable en laboratorio por su alta eficiencia.

Conclusiones

Esta investigación, demuestra que la producción de embriones bovinos a nivel mundial han revolucionado la ganadería moderna, ofreciendo herramientas poderosas para mejorar la eficiencia reproductiva y la calidad genética de los hatos, los embriones in vitro como los in vivo se crío preservan y transfieren de la misma manera pero la diferencia radica en el método de producción, la producción in vivo difieren de la in vitro en morfología, ultraestructura, perfiles lipídicos, fragilidad por choque criogénico y capacidad de desarrollo embrionario, en la actualidad, debido a la mejora de las condiciones de cultivo, el uso de crioprotectores y los diferentes métodos de congelación la producción in vivo sigue en desventaja con la producción in vitro, finalmente, debido a una maduración nuclear eficiente del embrión, la variabilidad en el tipo de donantes, utilización de otras tecnologías encargadas de manipular el sexo deseado, mayor disponibilidad en el mercado, mayor número de embriones al año y económicamente accesible, se ha visto un desempeño eficiente en la producción de embriones a través de laboratorio.

Referencias

- Acosta, M., Robledo, P., Londoño, L., Torres, V., & Vásquez, N. (2024). Effect of the Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) supplement on the development rate and quality of bovine embryos in vitro. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 35(1). doi:<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v35i1.25348>
- Allcca, Y., Rodríguez, A., Pozo, A., Herrera, A., & Sulca, L. (2023). Respuesta ovárica y embrionaria de dos protocolos de superovulación en bovinos altoandinos Pardo Suizo. *Revista De Investigaciones*

- Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 25(1), 49-55. doi:<https://doi.org/10.18271/ria.2023.490>
- Báez , F., Chávez , A., Hernández , H., & Villamediana, P. (2010). EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DESARROLLO in vitro DE OVOCITOS BOVINOS PROVENIENTES DE VACAS CON PREDOMINANCIA FENOTÍPICA *Bos taurus* Y *Bos indicus*. *Revista Científica*, 259 - 267. Obtenido de <https://www-redalyc-org.esпам.lookproxy.com/articulo.oa?id=95916116007>
- Banliat, C., Mahé, C., Lavigne, R., Com, E., Pineau, C., Labas, V., & Dizier, M. (2022). The proteomic analysis of bovine embryos developed in vivo or in vitro reveals the contribution of the maternal environment to early embryo. *BMC Genomics*, 23(839). doi:<https://doi-org.esпам.lookproxy.com/10.1186/s12864-022-09076-5>
- Borges , D., Benedetti, E., Demetrio, C., Fonseca, J., Olivera, M., Magalhães , Á., & Dos Santos, R. (2020). How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of Holstein embryos produced in vitro? (12 years of practical results at a California dairy farm). *Anim Reprod*, 17(3), e20200053. doi:<https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0053>
- Dellaqua, T. T., Vígaro, R. A., Janini, L. C., Dal-Canto, M. B., Renzini, M. M., Lodde, V., & Buratini, J. (2023). Neuregulin 1 (NRG1) modulates oocyte nuclear maturation during IVF and improves embryo development after IVF. *Teriogenología*, 195. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.10.041>
- Erdem, H., Karasahin, T., Alkan, H., Dursum, S., Satilmis, F., & Güler , M. (2020). Effect of embryo quality and developmental stages on pregnancy rate during fresh embryo transfer in beef heifers. *Trop Anim Health Prod*, 2541–2547. doi:<https://doi-org.esпам.lookproxy.com/10.1007/s11250-020-02287-6>
- Garza, D., Camacho, M., Manzanares, N., Moreno, G., & Kawas, J. R. (2023). Embryo performance and quality in superovulated Simmental donor cows after oral supplementation with different sources of omega-3 and omega-6 fatty acids. *Livestock science*, 277. doi:<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2023.105339>
- Goicochea, J., Rondón , W., Acosta, F., Gómez, Y., Montalvo, M., Salvatierra , M., . & Ratto, M. (2021). Efecto de dos medios de fertilización en el desarrollo in vitro de embriones bovinos criollos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(5). doi:<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i5.18709>
- Hassaneen, A. A., Rawy, M. S., Yamanokuchi, E., Elgandy, O., Kawano, T., Wakitani , S., & Osawab, T. (2023). Use of platelet lysate for in vitro production of embryos and treatment of repeated reproduction in cows. *Teriogenología*, 210, 199-206. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.07.034>
- Hayden, C. B., Sala, R. V., Pereira, D. C., Moreno, J. F., & García, Á. (2023). Effect of use and dosage of p-follicle-stimulating hormone for ovarian superstimulation before ovum pick-up and in vitro embryo production in pregnant Holstein heifers. *Dairy Science Magazine*, 106(11). doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2023-23576>

- Layek, S., Patil, S., Gorani, S., Karuppanasamy, K., Kishore, G., & Gupta, R. (2022). Recolección de óvulos y producción de embriones in vitro en bovinos. En A. S. Kumaresan, *Tecnologías de vanguardia en la reproducción bovina*. Springer, Singapur. doi:https://doi-org.esпам.lookproxy.com/10.1007/978-981-19-3072-0_11
- Lee, J., Lee, S., Ryu, G., Kim, D., Baek, H., Kim, J., & Choi, I. (2024). Retrospective analysis of conception by embryo transfer in dairy cattle in South Korea. *Theriogenology* 226, 363-368. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.07.001>
- Leite da Silva, W., Poehland, R., Carvalho de Oliveira, C., César, M., García de Almeida, R., Souza, M., & Melo, F. (2020). Shading effect on physiological parameters and in vitro embryo production of tropical adapted Nellore heifers in integrated crop-livestock-forest systems. *Trop Anim Health Prod*, 52(5). doi:10.1007/s11250-020-02244-3.
- Padovani, L., Silva, M., Borges, M., Pagoto, J., Watanabe, Y., Oliveira, C., & Morato, F. (2024). Injectable progesterone in 13-month-old prepubertal Nellore heifers: effects on in vitro embryo production and pregnancy rate. *Trop Anim Health Prod*, 56(8), 357. doi:<https://doi-org.esпам.lookproxy.com/10.1007/s11250-024-04205-6>
- Rodríguez, Á., y Reinoso, M. (2023). Las vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos durante la etapa de blastulación y eclosión reflejan su competencia de desarrollo in vitro. Obtenido de <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/11764>
- Sable, Y., Ibrahim, S., Madmoud, K., Ahmed, W., SA Ragab, R., & Seida, A. (2024). Expression profile of viability and stress response genes as a result of resveratrol supplementation in vitrified and in vitro produced cattle embryos. *Mol Biol Rep*, 51(1), 692. doi:<https://doi-org.esпам.lookproxy.com/10.1007/s11033-024-09614-2>
- Salgado, E., y Lopera, R. (2020). Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización in vitro en bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(3). doi:<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.17138>
- Santana, R., Vieira, T., & Sudano, M. (2022). Basic and applied characteristics in the cryopreservation process of bovine embryos. *Science of Animal Reproduction*, 239. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anir.eprosci.2022.106970>
- Sciorio, R., Cantatore, C., D'Amato, G., & Smith, G. (2024). Cryopreservation, cryoprotectants, and potential risk of epigenetic alteration. *J Assist Reprod Genet*. doi:10.1007/s10815-024-03287-3.
- Silva, M. V., Valente, R. S., Annes, K., Marsico, T. V., Oliveira, A. M., Bruna Aparecida Prado Maiollo, B., & Sudano, M. J. (2024). Effect of IL-10 and TNF- α on the competence and cryosurvival of *Bos indicus* embryos produced in vitro. *Theriogenology*, 215, 170-176. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.11.033>
- Somfai, T., & Hirao, Y. (2021). Vitrification of immature bovine oocytes in protein-free media: the impact of cryoprotective treatment protocol, base medium and ovary storage. *Theriogenology*, 172, 47-54. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.05.029>

- Thibier, M. (2005). The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod Nutr Dev*, 45(3), 235-42. doi :10.1051/rnd:2005016
- Valente , R. S., Marsico, T. V., Maiollo, B. P., Lopes, N. J., Tannura, J. H., & Sudano, M. J. (2024). Can the addition of interleukin-13 affect the cryosurvival of bovine embryos? *Theriogenology*, 215, 138-143. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.11.034>
- Wohlres, S., Pereira , M., Moreira, J., Machado, M., & Camargo, L. (2011). Comparison of gene expression in *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vivo or in vitro. *Livestock Science*, 140(1-3), 62-67. doi:<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2011.02.008>
- Zambrano, F., Hurtado, E. A., Arteaga, F., y Mendieta, D. (2020). Dos protocolos de superovulación en donantes de embriones en vacas mestizas en el trópico: Protocolos de superovulación en vacas mestizas. *La Técnica. Revista De Las Agrocencias*. 10(1), 33–44. https://doi.org/10.33936/la_tecnica.v0i23.1115