

# Del laboratorio al campo: gestación bovina producto de fecundación *in vitro*

Diego Fernando Dubeibe\*, MSc.<sub>1</sub>

<sub>1</sub> Laboratorio de Reproducción Animal, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Centro de Investigación, Tibaitatá, Colombia

---

Recibido: 10 de noviembre del 2015

Aprobado: 12 de febrero del 2016

\*Autor de correspondencia: Diego Fernando Dubeibe. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (corpoica), Km 14, vía Bogotá-Mosquera, Cundinamarca. Teléfono: (+57) 4227300 ext. 1486. Correo electrónico: [ddubeibe@corpoica.org.co](mailto:ddubeibe@corpoica.org.co)

Cómo citar este artículo: Dubeibe DF. Del laboratorio al campo: gestación bovina producto de fecundación *in vitro*. *Spei Domus*. 2016;12(24). doi: <http://dx.doi.org/10.16925/sp.v12i24.1892>

---

**Resumen.** *Propósito:* se reporta la primera gestación bovina obtenida en el Centro Académico Agropecuario Guatiguará de la Universidad Cooperativa de Colombia, luego de la transferencia de un embrión originado en el laboratorio de reproducción animal perteneciente al mismo centro, con la implementación de la técnica de producción *in vitro* de embriones. *Tema:* producir embriones *in vitro* implica establecer condiciones adecuadas en el laboratorio para que eventos biológicos como la preparación de los gametos, la fecundación y el desarrollo embrionario inicial se den en un ambiente diferente al natural. *Desarrollo:* se describen los procesos de obtención y maduración de ovocitos provenientes de ovarios de matadero, fertilización, cultivo embrionario, transferencia de embriones a vacas receptoras y diagnóstico gestacional mediante ultrasonografía. *Conclusiones:* la consecución de esta gestación confirma la capacidad de los embriones generados para continuar su desarrollo en el ambiente uterino y abre la posibilidad para futuros programas de mejoramiento genético.

**Palabras clave:** bovinos, embriones, gestación, producción *in vitro*.



## From the laboratory to the country: Bovine pregnancy as a result of *in vitro* fertilization. Case report

**Abstract.** *Purpose:* The first bovine pregnancy achieved by the Guatiguará Agricultural Academic Center at the Universidad Cooperativa de Colombia is reported, after the transfer of an embryo produced in the animal reproduction laboratory belonging to such center, with the implementation of the *in vitro* embryo production technique. *Theme:* Producing embryos *in vitro* involves establishing adequate conditions in the laboratory so that biological events such as the preparation of gametes, fertilization and initial embryonic development occur in an environment other than the natural one. *Development:* The processes of obtaining and maturing oocytes from slaughterhouse ovaries, fertilization, embryo culture, transfer of embryos to recipient cows, and gestational diagnosis by ultrasonography are described. *Conclusions:* The achievement of this pregnancy confirms the ability of embryos produced to continue their development in the uterine environment and opens up the possibility for future genetic enhancement programs.

**Keywords:** bovines, embryos, pregnancy, *in vitro* production.

## Do laboratório ao campo: gestação bovina resultado de fecundação *in vitro*

**Resumo.** *Propósito:* relata-se a primeira gestação bovina obtida no Centro Acadêmico Agropecuário Guatiguará da Universidad Cooperativa de Colombia, após a transferência de um embrião no laboratório de reprodução animal pertencente ao mesmo centro, com a implantação da técnica de produção *in vitro* de embriões. *Tema:* produzir embriões *in vitro* implica estabelecer condições adequadas no laboratório para que eventos biológicos como a preparação dos gametas, a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial aconteçam num ambiente diferente ao natural. *Desenvolvimento:* descrevem-se os processos de obtenção e amadurecimento de ovócitos provenientes de ovários de matadouro, fertilização, cultivo embrionário, transferência de embriões a vacas receptoras e diagnóstico gestacional mediante ultrassonografia. *Conclusões:* a consecução dessa gestação confirma a capacidade dos embriões gerados para continuar seu desenvolvimento no ambiente uterino e abre a possibilidade para futuros programas de aperfeiçoamento genético.

**Palavras-chave:** bovinos, embriões, gestação, produção *in vitro*.

## Introducción

La producción *in vitro* de embriones mamíferos implica el establecimiento de condiciones adecuadas en el laboratorio para que eventos biológicos complejos, tales como la preparación de los gametos, la fecundación y el desarrollo embrionario inicial, se den en un ambiente diferente al natural. El procedimiento para la producción de embriones en el laboratorio consta de varias etapas secuenciales. En términos generales, estas etapas se resumen en: obtención de ovocitos, maduración *in vitro*, fecundación *in vitro* y cultivo de los embriones [1].

Los primeros reportes del desarrollo de esta biotecnología datan de 1929, cuando Lewis y Gregory estudiaron el desarrollo *in vitro* de embriones utilizando como medio de cultivo plasma sanguíneo [2]. Sin embargo, debieron transcurrir varios años para que el primer caso exitoso de nacimiento de crías generadas por fecundación *in vitro* fuera reportado en mamíferos, evento que ocurrió en conejos en 1959 [3]. En humanos, el primer nacimiento fue documentado en Inglaterra en 1978 [4] y para el caso específico de la especie bovina, en 1982 se dio el nacimiento de *Virgil*, primer ternero obtenido gracias a la transferencia de un embrión de cuatro células producto de fecundación en el laboratorio [5].

A lo largo de los años, la técnica ha tenido que superar algunos inconvenientes. Por ejemplo, en sus inicios, pese a la posibilidad de obtener ovocitos madurados *in vivo* o de conseguir su completa maduración en condiciones artificiales, no existían procedimientos adecuados para lograr que los espermatozoides completaran el proceso de capacitación (requisito indispensable para la penetración espermática del ovocito) [6]. Otros inconvenientes relevantes tuvieron relación con el bloqueo de la división celular de los embriones y el crecimiento exagerado posterior de los fetos producidos (síndrome del becerro gigante), asuntos que obligaron a la implementación de modificaciones en las condiciones de cultivo y/o en las formulaciones de los medios de cultivo utilizados [7].

En la actualidad, a pesar de los avances, la eficiencia de la técnica, la calidad de los embriones producidos y la respuesta de esos embriones a los procesos de criopreservación lenta, son aspectos que aún requieren ser mejorados [8].

No obstante, el uso de esta biotecnología en diferentes especies con propósitos productivos, científicos, académicos e incluso clínicos, aumenta a un ritmo constante. La especie bovina figura como el

principal usuario de esta biotecnología. Según datos de la Sociedad internacional de transferencia de embriones (Internacional Embryo Transfer Society, IETS), en el 2013, se produjeron 546 628 embriones bovinos derivados de fecundación *in vitro*, lo que representa el 42% del total de embriones de esta especie producidos alrededor del mundo [9].

En Colombia, probablemente debido a la falta de asociatividad y/o simplemente a la falta de interés, no existen datos sobre el número de embriones producidos, transferidos o criopreservados. Sin embargo, a juzgar por la existencia de laboratorios certificados para ofrecer el servicio de producción de embriones *in vitro*, el nivel de uso de esta biotecnología en las explotaciones ganaderas colombianas es significativa.

El propósito de este documento es dar a conocer la primera gestación bovina obtenida en el Centro Académico Agropecuario Guatiguará de la Universidad Cooperativa de Colombia (UCC), luego de la transferencia de un embrión originado mediante la técnica de producción *in vitro* de embriones, llevada a cabo en el laboratorio de reproducción animal (LRA) del mismo centro.

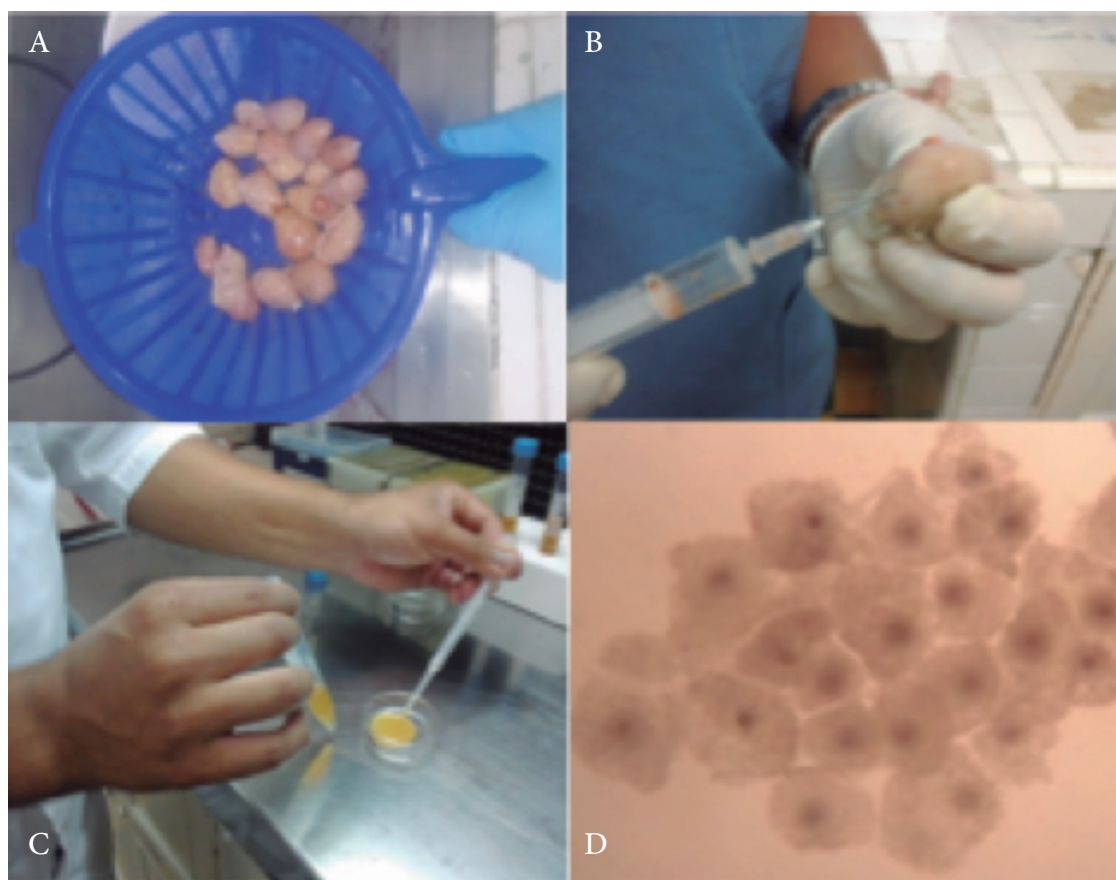
## Metodología

### Obtención de ovocitos

Como fuente de ovocitos se utilizaron ovarios provenientes de frigorífico (figura 1), los cuales fueron transportados hasta el laboratorio en solución salina fisiológica (NaCl 0,9 %) atemperada a 34 °C, en un tiempo no mayor a dos horas desde su recuperación en la planta de sacrificio.

Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados y mantenidos hasta el momento de su uso en la misma solución usada para el transporte. Con ayuda de aguja (18G X 1½”) y jeringa de 5 mL libre de látex (21G X 1½”), se realizó la punción de los folículos visibles en la superficie ovárica.

El líquido folicular colectado fue depositado en un tubo para centrifuga de 50 mL (Falcon®, Franklin Lakes, NJ, USA), en donde se dejó reposar durante 10 minutos para permitir la sedimentación de las células. Transcurrido este tiempo, el sedimento fue recuperado con ayuda de una pipeta *pasteur* plástica y colocado en placa de Petri de 100 X 15 mm (Falcon®, Franklin Lakes, NJ, USA).



**Figura 1.** Proceso para la obtención de ovocitos provenientes de ovarios de matadero. A: lavado y preparación de ovarios; B: punción folicular; C: recuperación de la fracción de líquido folicular rica en ovocitos; D: ovocitos recuperados y madurados *in vitro*

Fuente: elaboración propia

Bajo estéreo-microscopio (Leica zoom 2000®, Buffalo, NJ, USA), se recuperaron los ovocitos que presentaban citoplasma homogéneo y una camada nutrida y bien compacta de células del *cumulus* a su alrededor [10]. Se lavaron los ovocitos seleccionados pasándolos por cuatro gotas de 100  $\mu$ L de solución de mantenimiento (TCM/HEPES, suplementado con 5 % de suero fetal bovino [SFB], 50  $\mu$ g/mL de estreptomina y 50 UI/mL de penicilina), precalentadas en incubadora a 38,5 °C.

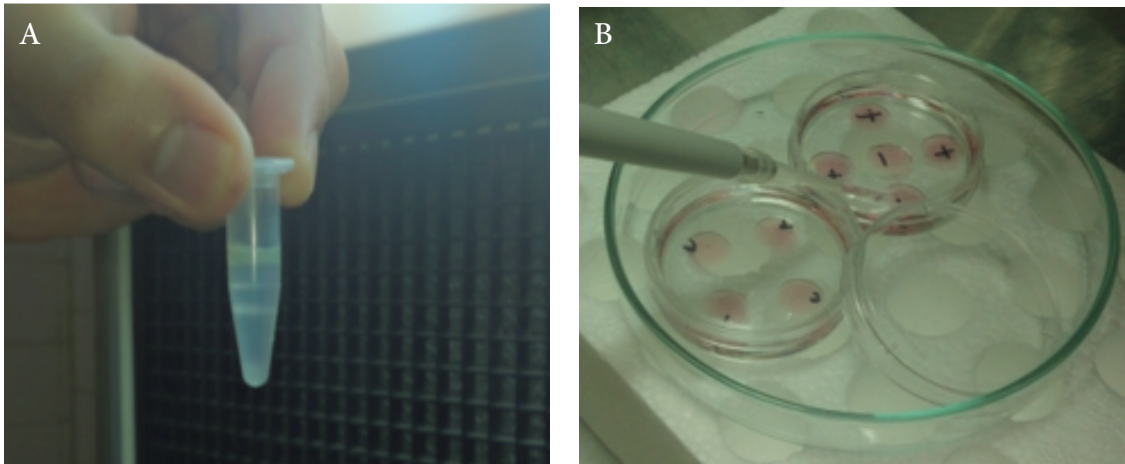
### Maduración *in vitro* de los ovocitos

Se colocaron grupos de veinte ovocitos en gotas de 100  $\mu$ L de medio de maduración (TCM suplementado con 10 % de SFB, 0,05 UI/mL de FSH/LH [Menopur® FERRING, Madrid, España], 50  $\mu$ g/mL de estreptomina, 50 UI/mL de penicilina, y 0,2 mM de Piruvato),

cubiertas con aceite mineral y pre-gasificadas y atemperadas durante tres horas en incubadora. La maduración de los ovocitos se realizó durante 22 horas en incubadora a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturada.

### Fertilización *in vitro*

Para el proceso de fertilización se utilizaron espermatozoides de toro raza Brahman Rojo, congelados en el propio LRA. Se descongeló una pajilla de 0,5 mL a 35 °C durante 40 segundos, su contenido fue depositado en un tubo de micro-centrifuga, e inmediatamente después se llevó a centrifugación (Minispin®, Eppendorf, USA) a 11 000 RPM, durante tres minutos en gradientes discontinuos de *percoll* (90 y 45%), para el lavado y selección de los espermatozoides viables (figura 2).



**Figura 2.** Proceso de fertilización *in vitro*. A: resultado del lavado espermático por centrifugación en gradientes de percoll; B: colocación de las dosis espermáticas en las gotas de medio de fertilización

Fuente: elaboración propia

Posterior a la recuperación del *pellet* de espermatozoides viables del fondo del tubo, se realizó una segunda centrifugación a 5500 RPM por 45 segundos en medio de lavado (*tyrodes*, *albumina*, *lactato*, *piruvato* [TALP]), buscando eliminar el exceso de *percoll*.

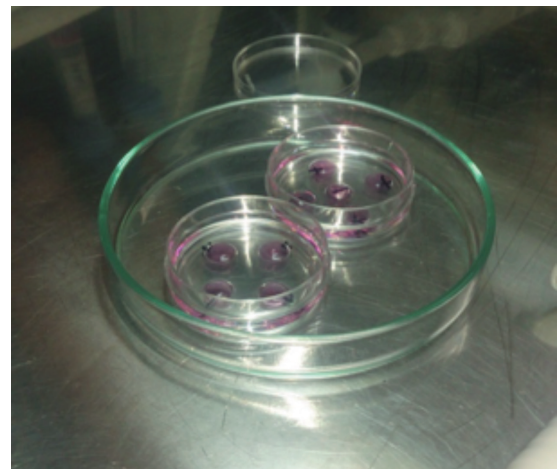
Las células espermáticas se co-incubaron con los ovocitos durante dieciocho horas en incubadora a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturada, a una concentración de 2 millones de espermatozoides/mL, en gotas de 100 µL de medio de fertilización (TALP, suplementado con 20 µg/mL de heparina y solución de PHE [2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina, y 0.25 mM de epinefrina]).

### Cultivo de los embriones

Posterior al proceso de fertilización, se mantuvo a los presuntos zigotos en grupos de veinte, puestos en cultivo en gotas de 100 µL de medio TCM suplementado con 10 % de SFB, 50 µg/mL de estreptomina, 50 UI/mL de penicilina y 1,5 mM de Piruvato (figura 3), durante siete días, en incubadora bajo las mismas condiciones de humedad, temperatura y concentración de gases utilizadas para la maduración y la fertilización *in vitro*.

Teniendo en cuenta que no hubo control sobre la concentración atmosférica de O<sub>2</sub>, los embriones se mantuvieron co-incubados con células del *cumulus* durante todo el periodo de cultivo.

Finalmente, a los cuatro días de cultivo, contando como día 0 el día de la fertilización, se realizó una renovación del 50% del volumen de las gotas del medio de cultivo y la evaluación del porcentaje de embriones que llevaban desarrollo normal, determinado por el número de células producto de las divisiones celulares, también llamadas divisiones de clivaje.



**Figura 3.** Gotas de medio de cultivo en cajas de Petri cubiertas con aceite mineral, dispuestas para el proceso de cultivo de los embriones

Fuente: elaboración propia

## Transferencia embrionaria

Transcurridos los siete días de cultivo se evaluó la producción de blastocitos. Del total de embriones producidos, se seleccionaron para ser transferidos solo aquellos que presentaban mejor calidad, juzgada de manera subjetiva, con base en su apariencia morfológica [11].

Como hembras receptoras, se emplearon vacas pertenecientes al centro académico agropecuario de la UCC, cuya presentación de celos había coincidido de manera natural con el día que estaba siendo realizada la fertilización de los ovocitos en el laboratorio.

Los embriones se colectaron de las gotas de medio de cultivo, lavados y montados de forma individual en pajillas de 0,25 mL en medio *holding* (Syngro® Bioniche, Pullman, USA). De esta modo fueron colocados en pistolas para transferencia (IMV®, L'Aigle, Francia) y finalmente depositados de manera individual en el cuerno uterino ipsilateral al ovario que presentaba el cuerpo lúteo.

## Diagnóstico de gestación

Se realizó un primer chequeo ecográfico de las vacas receptoras a los 45 días pos-transferencia de los embriones, con el objetivo de determinar su estado reproductivo. Mediante ecografía (Aloka® SSD-500, Tokio, Japón) del tracto reproductivo, realizada vía transrectal con sonda lineal de 7.5 MHz, fue diagnosticada como preñada la receptora que en la imagen ecográfica presentaba contenido uterino y una estructura compatible con una vesícula embrionaria.

Como medida de seguimiento y confirmación del estado reproductivo de la receptora gestante, la evaluación ecográfica se repitió a los noventa días de gestación y finalmente se hizo una palpación transrectal a los cinco meses de preñez.

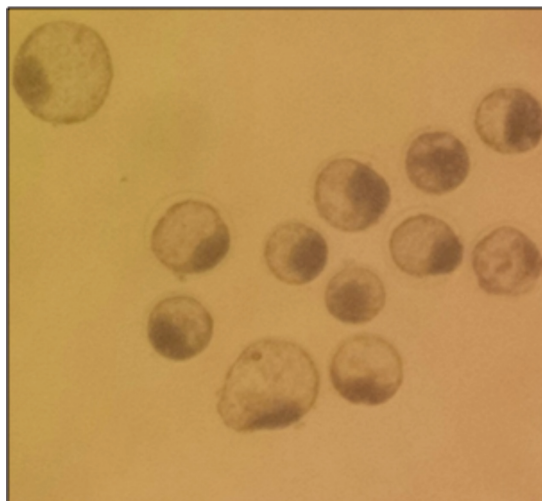
## Resultados

En total se colectaron, transportaron y puncionaron veinte ovarios de matadero. Producto de la aspiración folicular, se seleccionaron 180 ovocitos para iniciar el proceso de maduración en el laboratorio, obteniéndose por cada ovario puncionado

un promedio de recuperación de nueve ovocitos aptos para el procedimiento.

Todos los ovocitos madurados ( $n = 180$ ) fueron posteriormente fertilizados, para lo cual fue suficiente el contenido de una sola pajilla. Finalizado el proceso de fertilización, 170 presuntos cigotos se seleccionaron para continuar su desarrollo en el medio de cultivo.

Al cuarto día del cultivo, 55 embriones presentaron una adecuada división celular, correspondiente a una proporción del 32,4% de clivaje. Finalmente, a los siete días de cultivo, quince embriones alcanzaron el estado de blastocisto, obteniéndose una tasa de producción de embriones del 8,8% (figura 4).

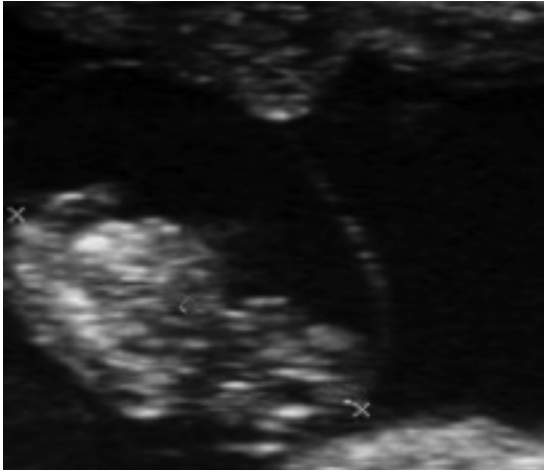


**Figura 4.** Embriones bovinos obtenidos siete días después de la fertilización *in vitro*

Fuente: elaboración propia

La presentación de celos naturales, en sincronía con el momento de la fertilización en el laboratorio, ocurrió en solo dos vacas, las cuales, siete días posteriores al día del celo, fueron empleadas como receptoras para los embriones producidos.

En el chequeo ecográfico llevado a cabo a los 45 días pos-transferencia, una de las dos receptoras que recibieron embrión fue diagnosticada como preñada (figura 5). Las evaluaciones posteriores del estado reproductivo, realizadas a los noventa días y a los cinco meses, confirmaron la presencia de un feto viable en gestación.



**Figura 5.** Imagen ecográfica de embrión bovino a los 45 días pos-transferencia al útero de vaca receptora

Fuente: elaboración propia

## Discusión

Se reporta el primer caso exitoso de gestación bovina en el Centro Académico Agropecuario Guatiguará de la UCC, producto de la transferencia de un embrión derivado de la técnica de producción *in vitro* de embriones, llevada a cabo en el LRA perteneciente al mismo centro.

Para realizar el procedimiento en el laboratorio, se utilizaron como materia prima, ovocitos obtenidos a partir de ovarios provenientes de matadero. El uso de ovarios de animales sacrificados en plantas de beneficio se justifica, pues son fuente de una cantidad suficiente, y a bajo costo, de ovocitos útiles para propósitos académicos y de investigación [12].

Aún en la actualidad, un número importante de trabajos experimentales realizados en la especie bovina, encaminados al estudio de los fenómenos reproductivos y al perfeccionamiento de las condiciones de maduración, fecundación y desarrollo embrionario *in vitro*, utilizan ovarios de matadero en sus procesos metodológicos [9].

Posterior a la aspiración folicular, la cantidad de ovocitos con aspecto viable que pueden recuperarse, llega a ser altamente variable [13]. En este caso, se obtuvieron y clasificaron como aptos nueve ovocitos por cada ovario puncionado, lo que supondría una recuperación de 18 estructuras/vaca sacrificada.

Se determinó que la tasa de recuperación ovocitaria pos-aspiración folicular podría estar influenciada por factores inherentes a las hembras donadoras

de gametos y por otros relacionados a la técnica utilizada [14]. En este sentido, aspectos como la edad, la raza, la fase del ciclo estral, el diámetro folicular, la frecuencia de colectas (en el caso de aspiración folicular de animales vivos), el tipo de técnica utilizada (*Slicing*, *ovum pick up* [OPU], aguja acoplada a jeringa, entre otras), pero principalmente, la experticia del personal que manipula los ovarios, tienen una importante repercusión en el número de estructuras que pueden ser obtenidas por sesión [15].

Teniendo en cuenta la elevada variabilidad obtenida en los ovarios de matadero con relación a algunas de las variables anteriormente mencionadas, es difícil fijar un valor óptimo de recuperación ovocitaria para este trabajo; sin embargo, debido a que son animales de la raza Brahman (*Bos indicus*) los que habitualmente entran para sacrificio en los frigoríficos de la región, es de esperarse una recuperación media/alta de ovocitos [16, 17], la cual coincide con lo obtenido.

La tasa final de producción de embriones en estado de blastocisto para este caso fue de 8,8%. El éxito en los programas de producción *in vitro* de embriones está determinado por la calidad de los gametos utilizados como materias primas para el procedimiento (ovocitos y espermatozoides), así como también por las condiciones microambientales dadas a las células en cultivo dentro del laboratorio [13].

De manera particular, la calidad de los ovocitos juega un papel preponderante en el procedimiento y guarda una estrecha relación con la cantidad de blastocistos que puedan llegar a ser producidos [18] y, por su parte, aspectos relacionados a las condiciones reproductivas, nutricionales, sanitarias e incluso de manejo de las vacas donadoras de los ovocitos, pueden afectar la capacidad de estos gametos para ser fertilizados y posteriormente desarrollarse como embriones viables [19].

Haciendo uso de ovarios de matadero como fuente primaria para la obtención de los ovocitos, la población de este tipo celular llega a ser altamente heterogénea en relación a su competencia de desarrollo pos-fecundación *in vitro*, de esta manera, existiría una alta variabilidad en la producción final de embriones, que incluso podría fluctuar en promedio entre el 10 y el 60% [15]. Pero, además, no se descarta que otros factores asociados a la calidad del semen utilizado y a las condiciones de cultivo en las que fueron mantenidos los gametos y los embriones, hayan influido en los resultados.

Del total de embriones producidos, dos se transfirieron a vacas receptoras, y de estos, se obtuvo una

preñez. Son diversos los factores que pueden afectar el logro de gestación a partir de la transferencia de embriones generados *in vitro*. De modo general, la calidad de los embriones, el ambiente del tracto reproductivo de las receptoras al momento de la transferencia y la sincronía del tiempo de desarrollo embrionario con respecto a los días transcurridos después del celo de las receptoras, repercuten en el éxito del procedimiento [20].

Para este caso, se clasificaron los embriones transferidos siguiendo las directrices dadas por la IETS en relación a la morfología predictiva de la calidad embrionaria [11]. Además, se seleccionaron las receptoras utilizando como criterios el momento de presentación del celo y la apariencia del cuerpo lúteo y del tracto reproductivo, las cuales fueron observadas en chequeo ecográfico realizado justo antes de la transferencia de los embriones.

## Conclusiones

La consecución de una gestación pos-transferencia de un embrión producido en condiciones de laboratorio al interior de las instalaciones del Centro Académico Agropecuario Guatigurá, denota capacidad de las estructuras obtenidas para continuar su desarrollo en el ambiente uterino.

La importancia de este evento se enmarca en la posibilidad futura de ejecutar programas de mejoramiento genético mediante la producción de embriones a bajo costo que pudieran ser direccionados, incluso, para programas de extensión a la comunidad. No obstante, previo a su aplicabilidad, es necesario realizar un seguimiento detallado de las características de esta gestación y de las particularidades de la cría generada posteriormente, con el propósito de evaluar los posibles impactos de las condiciones artificiales en las cuales los embriones están siendo originados [21].

## Referencias

- Herradón PG, Quintela LA, Becerra JJ, Ruibal S, Fernandez M. Fecundación *in vitro*: Alternativa para la mejora genética en bovinos. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 2007; 15(1):33-40.
- Lewis WH, Gregory PW. Cinematographs of living developing rabbit-eggs. Science. 1929;69:226-229.
- Chang MC. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. Nature. 1959;184: 466-467.
- Stephoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. London, England: Lancet; 1978.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. Biol. Reprod. 1982;27: 147-158.
- Parrish JJ. Bovine *in vitro* fertilization: *in vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. Theriogenology. 2014;81: 67-73. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.08.005
- Chronopoulou E, Harper JC. *ivf* culture media: past, present and future. Hum. Reprod. Update. 2014;21(1):39-55. doi: 10.1093/humupd/dmu040
- Varago FC, Lagares M. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectivas de uma técnica em constante evolução. Rev Bras Reprod Anima. 2008;32(2): 100-109.
- Perri G. 2013 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Embryo transfer newslett. 2015;33: 14-26.
- Leibfried L, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. J Anim Sci. 1979;48: 76-86.
- Wright JM. Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. En: Manual of the International Embryo Transfer Society. Savoy, I.L.: Stringfellow D.A.; 1998. p. 167-170.
- Golçalves PBD, Barreta MH, Snadri LR, Ferreira R, Antoniazzi AQ. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. Rev Bras Reprod Anim. 2007; 31(2):212-219.
- Boni R. Origins and effects of oocyte quality in cattle. Anim Reprod. 2012;9(3): 333-340.
- Boni R. Ovum Pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. Anim Reprod. 2012;9(3): 362-369.
- Merton JS, de roos APW, Mullaart E, de ruigh L, kal L, Vos PALM. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. Theriogenology. 2003;59: 651-674.
- De Roover R, Feugang JM, Bols PE, Genicot G, Hanzzen CH. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle *in vitro* embryo production. Reprod Domest Anim. 2008;43: 239-245. doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00873.x
- Guerreiro BM, Batista EOS, Vieira LM, Sá filho MF, Rodrigues CA, Castro Netto A, et al. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for *in vitro* embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. Domest Anim Endocrinol. 2015;49: 96-101. doi: 10.1016/j.domaniend.2014.07.002

18. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. 2006;65: 126-136.
19. Barusselli PS, Vieira LM, Batista EOS, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU. Updates on embryo production strategies. *Anim Reprod*. 2015;12(3): 375-382.
20. Andrade GA, Fernandes MA, Knychala RM, Pereira Junior MV, Oliveira AJ, Nunes DP. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. *Rev Bras Reprod Anim*. 2012;36(1): 66-69.
21. Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, de la Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Dom Anim*. 2008;43(4):44-50. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x