

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA
MOLINA**

FACULTAD DE ZOOTECNIA



**“MOMENTO DE BLASTULACIÓN PARA
SELECCIONAR EMBRIONES VIABLES
MONITOREADA POR TECNOLOGÍA TIME-LAPSE”**

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE
INGENIERA ZOOTECNISTA**

CARMEN PATRICIA HUAYHUA LLACHO

LIMA – PERÚ

2022

La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación

(Art. 24 – Reglamento de Propiedad Intelectual)

Document Information

Analyzed document	Tesis Carmen Huayhua- version entrega 21nov.pdf (D150497259)
Submitted	11/22/2022 2:14:00 AM
Submitted by	Edwin mellisho
Submitter email	emellisho@lamolina.edu.pe
Similarity	0%
Analysis address	emellisho.unalm@analysis.urkund.com

Sources included in the report

SA	Seminario-AP-phD-BarbaraMelo-4-08-20.docx Document Seminario-AP-phD-BarbaraMelo-4-08-20.docx (D78165628)		1
SA	TESIS LENIN TINOCO.pdf Document TESIS LENIN TINOCO.pdf (D114271683)		1
SA	TFM Magalí Cufre Barbieri.pdf Document TFM Magalí Cufre Barbieri.pdf (D141463721)		1

Entire Document

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA FACULTAD DE ZOOTECNIA "MOMENTO DE BLASTULACIÓN PARA SELECCIONAR EMBRIONES VIABLES MONITOREADA POR TECNOLOGÍA TIME-LAPSE" TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE INGENIERA ZOOTECNISTA CARMEN PATRICIA HUAYHUA LLACHO LIMA – PERÚ 2022 La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación (Art. 24 – Reglamento de Propiedad Intelectual)

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA FACULTAD DE ZOOTECNIA "MOMENTO DE BLASTULACIÓN PARA SELECCIONAR EMBRIONES VIABLES MONITOREADA POR TECNOLOGÍA TIME-LAPSE" Presentado por: CARMEN PATRICIA HUAYHUA LLACHO TESIS PARA OPTAR TÍTULO DE INGENIERA ZOOTECNISTA Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado: _____ Dr. Gustavo Gutierrez Reynoso Presidente
_____ Ing. Amalia Gallegos Cardenas Mv. Segundo Gamarra Carrillo Miembro Miembro _____ Dr. Edwin Mellisho Salas Asesor

DEDICATORIA A mis padres Magda y Mario, a mi hermano, por creer siempre en mí, por haberme apoyado en todo momento, ya que sin ellos nada de esto sería posible. A todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS A mi Patrocinador de tesis al PhD Edwin Mellisho Salas, por la orientación y ayuda para la realización de esta tesis. Gracias por la oportunidad brindada. Un agradecimiento especial a PROCIENCIA - CONCYTEC, de acuerdo al contrato N° 143- 2020 – FONDECYT. A los miembros del jurado evaluador: Dr. Gustavo Gutiérrez Reynoso, 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 las experiencias y momentos vividos.

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE ZOOTECNIA

**“MOMENTO DE BLASTULACIÓN PARA SELECCIONAR
EMBRIONES VIABLES MONITOREADA POR TECNOLOGÍA
TIME-LAPSE”**

Presentado por:

CARMEN PATRICIA HUAYHUA LLACHO

TESIS PARA OPTAR TÍTULO DE INGENIERA ZOOTECNISTA

Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado:

Dr. Gustavo Gutierrez Reynoso
Presidente

Ing. Amalia Gallegos Cardenas
Miembro

Mv. Segundo Gamarra Carrillo
Miembro

Dr. Edwin Mellisho Salas
Asesor

DEDICATORIA

A mis padres Magda y Mario, a mi hermano, por creer siempre en mí, por haberme apoyado en todo momento, ya que sin ellos nada de esto sería posible.

A todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A mi Patrocinador de tesis al PhD Edwin Mellisho Salas, por la orientación y ayuda para la realización de esta tesis. Gracias por la oportunidad brindada.

Un agradecimiento especial a PROCIENCIA - CONCYTEC, de acuerdo al contrato N° 143-2020 – FONDECYT.

A los miembros del jurado evaluador: Dr. Gustavo Gutiérrez Reynoso, 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 las experiencias y momentos vividos.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCION	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.	Desarrollo embrionario temprano	3
2.1.1.	Primera división embrionaria	3
2.1.2.	Activación del genoma embrionario	4
2.1.3.	Diferenciación celular y blastulación	5
2.1.4.	Eclosión y elongación del blastocisto	7
2.1.5.	Reconocimiento materno-embrionario	9
2.2.	Técnicas de selección de embriones	10
2.2.1.	Morfología	11
2.2.2.	Morfocinética	12
2.2.3.	Diagnóstico Genético Preimplantacional	13
2.2.4.	Desarrollo post eclosión	14
2.3.	Aplicaciones de la tecnología de embriones	15
2.3.1.	Producción <i>in vivo</i> de embriones	15
2.3.2.	Producción <i>in vitro</i> de embriones	16
III.	METODOLOGÍA	21
3.1.	Lugar	21
3.2.	Recuperación de complejo cúmulus ovocito	21
3.3.	Producción de embriones <i>in vitro</i> en bovinos	22
3.4.	Monitoreo del desarrollo embrionario: tiempo de blastulación	23
3.5.	Desarrollo embrionario post eclosión: viabilidad <i>in vitro</i>	25
3.6.	Grupos experimentales	26
3.7.	Análisis estadístico	26
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1.	Producción de embriones bovinos <i>in vitro</i> en sistema time-lapse	28
4.2.	Desarrollo embrionario post eclosión	29
4.3.	Impacto del momento de blastulación en el desarrollo embrionario	30
4.4.	Efecto de la viabilidad y blastulación en el desarrollo embrionario	32
4.5.	Modelo matemático para predecir viabilidad	33
V.	CONCLUSIONES	37
VI.	RECOMENDACIONES	38

VII. BIBLIOGRAFÍA

39

VIII. ANEXOS

60

INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1: Criterios morfológicos para selección de embriones según la International Embryo Technology Society (IETS)	12
TABLA 2: Estudios en los que se empleó la selección embrionaria por morfocinética	13
TABLA 3: Logros históricos que revolucionaron en la producción <i>in vitro</i> de embriones	18
TABLA 4: Tasa de blastocistos y preñez de embriones producidos <i>in vitro</i> a partir de ovocitos recuperados por técnica ovum pick-up (OPU)	20
TABLA 5: Producción de embriones bovinos <i>in vitro</i> en sistema time-lapse y cultivo en gotas (control)	28
TABLA 6: Características de los embriones cultivados <i>in vitro</i> según de viabilidad <i>in vitro</i>	29
TABLA 7: Características de los embriones cultivados <i>in vitro</i> según momento de blastulación	31
TABLA 8: Características de los embriones cultivados <i>in vitro</i> según viabilidad y momento de blastulación	32
TABLA 9: Modelos predictivos no invasivos de competencia embrionaria con el uso de regresión logística binaria	34
TABLA 10: Parámetros de regresión logística del Modelo-1 para predecir la competencia embrionaria	34

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Ciclo celular durante la maduración meiótica y fecundación del ovocito de ratón	4
FIGURA 2. Expresión diferencial de genes durante el desarrollo embrionario temprano	5
FIGURA 3. Polarización en el desarrollo embrionario en bovinos, uniones gap y tight	6
FIGURA 4. Formación de blastocele durante el desarrollo embrionario en bovinos	7
FIGURA 5. Imágenes de embriones bovinos que eclosionan desde la zona pelúcida a través del polo embrionario (a, b) y el polo abembrionario (c, d)	8
FIGURA 6. Vistas microscópicas y macroscópicas de embriones bovinos en la etapa de peri-implantación. Esférico (S), ovoide (O), tubular (T) y filamentosos (F)	9
FIGURA 7. Diagrama que muestra la relación entre las concentraciones circulantes de progesterona (P4), las alteraciones del entorno uterino y el impacto posterior en el alargamiento del conceptus y la producción de interferón-tau (IFN-t)	10
FIGURA 8. Número de embriones bovinos (derivados <i>in vivo</i> , producidos <i>in vitro</i>) registrados en el período 2000-2019	16
FIGURA 9. Número de embriones bovinos producidos <i>in vitro</i> en el período 2000-2019, por continente	20
FIGURA 10. Sistema Primovision® para monitorear el desarrollo embrionario individual	24
FIGURA 11. Imagen de blastocisto al día 7 Post IVF del un micropocillo (C4) observado con sistema time-lapse (Primovisión®).	24
FIGURA 12. Esquema del diseño experimental.	27
FIGURA 13. Valor de precisión ROC-AUC de los modelos matemáticos para predecir viabilidad <i>in vitro</i> . Modelo 1, incluyó todas las variables (B, tSB, tB, DtSB, DtB, E7.5, Q7.5, D7.5); modelo 2, incluyó las variables D7.5, B, E7.5, DtSB; modelo 3, incluyó la variable D7.5, modelo 4, incluyó las variables D7.5 y DtSB.	35

INDICE DE ANEXOS

	Página
ANEXO 1. Análisis de varianza de tasa de clivaje y blastocisto del grupo control con micropocillos.	60
ANEXO 2. Análisis de varianza de variables según viabilidad <i>in vitro</i> .	60
ANEXO 3. Análisis de varianza de variables según blastulacion temprana y tardía.	61
ANEXO 4. Análisis de varianza del tiempo de blastulacion y viabilidad <i>in vitro</i> .	62
ANEXO 5. Gráficos de la característica operativa del receptor con la determinación del área bajo la curva (ROC-AUC) de distintas variables sobre la viabilidad embrionaria	64

RESUMEN

Tradicionalmente, la selección de embriones bovinos para transferencia se basa en sus características morfológicas por ser simple y rápido, sin embargo, los valores cualitativos tienen una baja precisión para predecir competencia embrionaria. Por lo tanto, es necesario incluir medidas de características objetivas y no invasivas como el tiempo de blastulación, para incrementar la precisión del método de selección. El objetivo de este estudio fue evaluar el momento de blastulación monitoreada por tecnología time-lapse para seleccionar embriones con viabilidad *in vitro* determinada por desarrollo post eclosión. Los complejos de ovocitos cumulus (COCs) se maduraron durante 23 horas y luego se fertilizaron mediante la incubación de COCs con espermatozoides (10.000 espermatozoides por ovocito) durante 18 horas. Los presuntos cigotos se colocaron individualmente en micropocillos, en gotas de medio de cultivo comercial. El sistema Primo Vision TL (EVO+; Vitrolife, Gotemburgo, Suecia) capturó imágenes digitales de embriones en desarrollo cada 15 minutos. Se registraron los periodos de tiempo desde la FIV hasta el inicio de la blastulación (tSB) y el desarrollo del blastocisto (tB). La viabilidad *in vitro* de los embriones se determinó utilizando un sistema de cultivo *in vitro* extendido de embriones bovinos hasta el día 9,5 (desarrollo posterior a la eclosión). Los parámetros para establecer la viabilidad *in vitro* (día 9,5 después de la FIV) fueron: diámetro superior a 200 μm y recuento total de células de blastocisto superior a 190. Para determinar el poder predictivo de la blastulación temprana (valor 1) o tardía (valor 0) se estimaron mediante el área bajo la curva ROC (AUC). Además, se utilizó análisis de regresión logística binaria para generar un modelo matemático con variables morfocinéticas que permite la más alta predicción de la viabilidad *in vitro*. En 13 sesiones, la tasa de producción de blastocistos ascendió a 46,2% (96/208). El punto de corte del tiempo para discriminar como blastulación temprana o tardía fue de 149.8 h. La viabilidad *in vitro* de los embriones con blastulación temprana fue de 63,3 % (31/49), siendo superior estadísticamente ($p=0,001$) al grupo de blastulación tardía 14,9% (7/47). Asimismo, el momento de blastulación mostró una precisión del 90,8 % (IC 95 %, 0,833–0,983; $P < 0,001$) para predecir la viabilidad *in vitro*. En conclusión, el tiempo de blastulación permite predecir la viabilidad *in vitro* del embrión bovino.

PALABRAS CLAVE: Momento de blastulación, selección embrionaria, desarrollo post eclosión, bovino.

ABSTRACT

Traditionally, the selection of bovine embryos for transfer is based on their morphological characteristics, as it is simple and fast, however, qualitative values have a low precision to predict embryonic competence. Therefore, it is necessary to include measurements of objective and non-invasive traits to increase the accuracy of the selection method. The objective of this study was to evaluate the moment of blastulation monitored by time-lapse technology to select embryos with *in vitro* viability determined by post-hatching development. Cumulus oocyte complexes were matured for 23 hours and then fertilized by incubating COCs with sperm (10,000 sperm per oocyte) for 18 hours. Presumptive zygotes were placed individually in microwells, in droplets of commercial culture medium. The Primo Vision TL system (EVO+; Vitrolife, Gothenburg, Sweden) captured digital images of developing embryos every 15 minutes. The time frame from IVF to the start of blastulation (tSB) and to blastocyst development (tB) were recorded. Viable embryos were determined using an *in vitro* extended bovine embryo culture system up to day 9.5 (post-hatching development). The parameters to establish *in vitro* viability (day 9.5 after IVF) were: a diameter greater than 200 μm and a total blastocyst cell count greater than 190. To determine the predictive power of early (value 1) or late blastulation (value 0) the areas under the ROC curve (AUC) were estimated. In addition, binary logistic regression analysis was used to generate a mathematical model with morphokinetic variables that allow the best prediction of *in vitro* viability. In 13 sessions, the blastocyst production rate was 46.2% (96/208). The time cut-off point to discriminate as early or late blastulation was 149.8 h. The *in vitro* viability of the embryos with early blastulation was 63.3% (31/49), being statistically superior ($p=0.001$) to the late blastulation group 14.9% (7/47). Likewise, the time of blastulation showed an accuracy of 90.8% (95% CI, 0.833–0.983; $P < 0.001$) in predicting *in vitro* viability. In conclusion, the blastulation time allows predicting the *in vitro* viability of the bovine embryo.

Keywords: Blastulation time, embryo selection, post-hatching development, bovine

I. INTRODUCCION

La selección tradicional de embriones bovinos obtenidos *in vitro* para su posterior transferencia se basa fundamentalmente en características morfológicas (Sugimura *et al.*, 2017). Esta clasificación de blastocistos se considera subjetiva e inadecuada, debido a la baja y variable correlación con la tasa de éxito en la implantación, en bovinos (37 a 52%) y humanos (30%) (Farin *et al.*, 1999); por lo tanto, se requieren nuevos criterios no invasivos que permitan una selección objetiva y más precisa de los embriones (Farin *et al.*, 1995). De esta manera los embriones que alcanzarán la etapa de blastocisto tendrían menos probabilidades de presentar anomalías cromosómicas y aumentarían las tasas de implantación postransferencia (Borini *et al.*, 2006).

Algunas técnicas modernas que permiten seleccionar embriones de mejor calidad son el diagnóstico genético preimplantacional y la evaluación del contenido mitocondrial, sin embargo, estas son invasivas para el embrión. (Ho *et al.*, 2018). Por lo tanto, el monitoreo del desarrollo embrionario con tecnología time-lapse es un método no invasivo que permite obtener imágenes digitales continuas del desarrollo embrionario *in vitro* (Wong *et al.*, 2010). Estudios indican que la selección de embriones competentes empleando tecnologías de monitoreo continuo (sistema time-lapse), son métodos más precisos para identificar embriones con mayor capacidad implantatoria (Lemmen *et al.*, 2008; Pribenszky *et al.*, 2010a; Wong *et al.*, 2010; Meseguer *et al.*, 2011). Además, la facilidad de su aplicación, reduce la exposición de los embriones a cambios de pH, temperatura, presión osmótica e iluminación que pueden causar efectos negativos sobre su calidad y desarrollo (Zhang *et al.*, 2010).

Varios investigadores, han centrado sus trabajos en la primera división embrionaria (Van Soom *et al.*, 1992; Grisart *et al.*, 1994; Mateusen *et al.*, 2005; Rehman *et al.*, 2007 ; Wong *et al.*, 2010; Lewis *et al.*, 2019; Sugimura *et al.*, 2012) y en el momento de blastulación (Mumusoglu *et al.*, 2017) como predictores de la implantación en humanos, ya que se ha reportado que una blastulación temprana tiene una correlación positiva con la tasa de preñez (Shapiro *et al.*, 2008; Capalbo *et al.*, 2014; Kaing *et al.*, 2017), por lo tanto, se necesitan equipos sofisticados para realizar estos estudios (Niimura *et al.*, 2010; Sugimura *et al.*, 2012).

El sistema de monitoreo continuo puede ser una herramienta poderosa en la producción y selección de embriones bovinos con alta capacidad implantatoria; sin embargo, es poco utilizada en la transferencia de embriones en bovinos (Sugimura *et al.*, 2012; Mellisho *et al.*, 2019). Asimismo, no existen trabajos sobre la selección de embriones bovinos basados en el momento de blastulación usando tecnología de monitoreo continuo, por lo que el presente trabajo tiene como objetivo general, evaluar el momento de blastulación monitoreada por tecnología time-lapse para seleccionar embriones con viabilidad *in vitro* determinada por desarrollo post eclosión. Siendo los objetivos específicos, 1) Determinar el efecto del momento de blastulación monitoreada por tecnología time-lapse en el desarrollo embrionario post eclosión y 2) Establecer el modelo matemático para la selección de embriones viables basado en su morfología y momento de blastulación monitoreada por tecnología time-lapse.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Desarrollo embrionario temprano

El desarrollo embrionario temprano es un periodo crítico, debido a los cambios morfológicos y bioquímicos relacionados con la actividad genómica y complejos procesos fisiológicos, muchos de los cuales aún son desconocidos (Gad *et al.*, 2011). Dentro de las etapas más importantes tenemos: primera división, activación del genoma embrionario, diferenciación celular y blastulación, eclosión y elongación embrionaria y reconocimiento materno-embrionario.

2.1.1. Primera división embrionaria

La transición del gameto femenino (ovocito) a un cigoto totipotente es un proceso complejo (Figura 1). Una vez que el ovocito alcanza la primera profase meiótica, hay una pausa larga en el ciclo celular que proporciona tiempo para el almacenamiento de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteínas necesarias para llevar a cabo el metabolismo del gameto y primeras divisiones embrionarias (Bachvarova, 1985; Nothias *et al.*, 1995; Page y Orr-Weaver, 1997). El proceso de maduración del ovocito inicia en el estadio de vesícula germinal (GV) y culmina como metafase II (Downs, 2010). En este proceso, un núcleo agrandado, que se llama vesícula germinal, sufre degradación que permite la progresión de la meiosis, liberando el primer cuerpo polar. Un pico de la hormona luteinizante (LH) reanuda la meiosis, y finalmente los ovocitos ovulan en la etapa metafase II, donde permanecen detenidos hasta que ocurre la fecundación.

La fusión del ovocito y el espermatozoide da como resultado un cigoto con dos pronúcleos haploides. La singamia gamética se completa después de la primera ronda de replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), cuando las membranas pronucleares se disuelven, permitiendo que los cromosomas maternos y paternos se entrecrucen (Halstead *et al.*, 2020). Luego, el cigoto completa la última fase de la meiosis e inmediatamente se produce la primera división embrionaria y la reanudación de la replicación del ADN (Hwang *et al.*, 2001; Kubiak *et al.*, 2008).

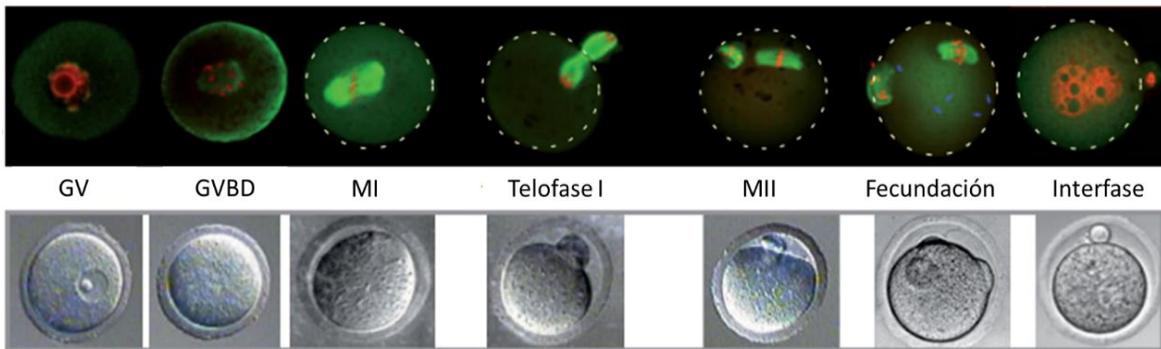


Figura 1. Ciclo celular durante la maduración meiótica y fecundación del ovocito de ratón. GV: vesícula germinal; GCB: ruptura de vesícula germinal; MI: Metafase I; MII: Metafase II (Kubiak *et al.*, 2008).

En bovinos, la aparición de estas primeras divisiones ocurren respectivamente (h.p.i.: horas post inseminación): 2-células (24.1 h.p.i), 3-células (32.7 h.p.i), 4-células (34.9 h.p.i), 5-células (41.6 h.p.i) (Alomar *et al.*, 2008). En condiciones *in vitro*, el tiempo de la primera división de los cigotos bovinos afecta la tasa de desarrollo y el número de células de blastocistos (Dinnyés *et al.*, 1999; Brevini *et al.*, 2002; Gutiérrez-Adán *et al.*, 2004), esto debido a que el tiempo de la primera división está relacionado con el estado de poliadenilación y transcripción de genes importantes para el desarrollo embrionario temprano (Lonergan *et al.*, 2000).

2.1.2. Activación del genoma embrionario

El inicio del desarrollo embrionario temprano está controlado por transcritos (ARNm) y proteínas maternas producidas y almacenadas durante la ovogénesis (Tadros y Lipshitz, 2009). A medida que avanza el desarrollo embrionario, el control materno (transcritos y proteínas) se reduce paulatinamente y los transcritos y proteínas derivadas del embrión toman control (Memili y First, 2000; Graf *et al.*; 2014). La activación del genoma embrionario (EGA) es menor en etapa de división temprana (Ram y Schultz, 1993; Abe, 2018) alcanzando un EGA máxima entre la etapa de 8 y 16 células en bovinos (Figura 2) (Graf *et al.*, 2014). Este paso de la dependencia materna a la autosuficiencia embrionaria involucra los siguientes eventos: agotamiento de los transcritos maternos por degradación y traducción; reemplazo de transcritos maternos almacenados en ovocitos por transcritos embrionarios y la generación de nuevos transcritos del embrión (Sirard, 2010).

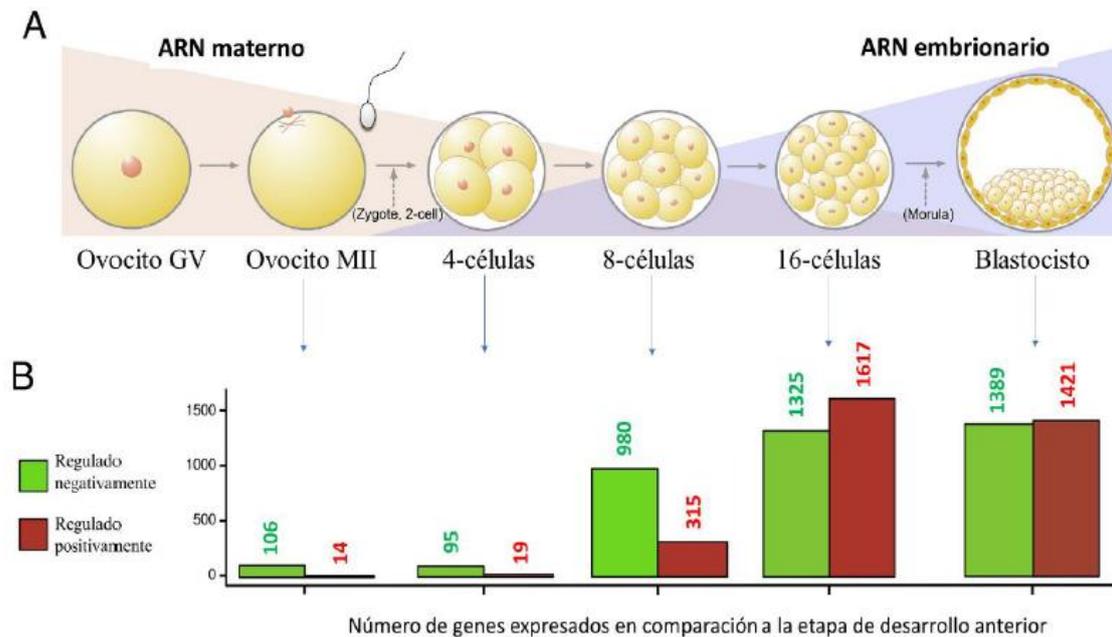


Figura 2. Expresión diferencial de genes durante el desarrollo embrionario temprano (Adaptado de Graf *et al.*, 2014).

2.1.3. Diferenciación celular y blastulación

Durante la etapa pre implantatoria, el embrión pasa por varias divisiones mitóticas para transformarse en un blastocisto compuesto por un mínimo de 100 blastómeros (Lechniak *et al.*, 2008). En este periodo ocurren cambios morfológicos y funcionales en las células o blastómeros que son fundamentales para el desarrollo posterior, dando como resultado un proceso que es conocido como compactación embrionaria (Coticchio *et al.*, 2019). La compactación embrionaria en bovinos ocurre entre 16 a 32 células, durante este proceso ocurre la redistribución de las microvellosidades, cambios en las uniones celulares, proliferación mitótica y polarización citoplásmica que contribuyen directamente a la formación del blastocisto (Iwata *et al.*, 2008). La compactación da origen a una estructura llamada mórula, cuyos blastómeros se agrupan zonalmente diferenciándose en células externas o polares y las internas o no polares (Figura 3). Las células externas tienen uniones tight (tight junctions) que reducen el espacio intercelular e impide la difusión de lípidos y proteínas a través de la membrana plasmática, contribuyendo de esta manera a la polaridad celular. Por otro lado, las células internas tienen uniones gap (gap junctions), las cuales mantienen la comunicación intercelular al permitir el paso de moléculas como el Adenosín

Monofosfato cíclico (AMPC) y el calcio (Ca^{2+}) (Fleming y Pickering, 1985; Handyside, 1980; Johnson y McConnell, 2004).

Los grupos de células internas y externas continuaran su diferenciación celular hacia las dos líneas celulares que conforman un blastocisto (White *et al.*, 2016). La formación de blastocisto en mamíferos se caracteriza por dos diferenciaciones consecutivas de linaje celular. El primer evento de diferenciación da como resultado la formación del trofoectodermo, que participa en la formación de los tejidos extraembrionarios y la masa celular interna, que dará origen al embrión propiamente dicho y a las membranas extraembrionarias. Esto ocurre alrededor del día 6-7 después de la fecundación. Posteriormente, alrededor del momento de eclosión (día 8 post inseminación) ocurre una segunda diferenciación celular donde la masa celular interna se divide en epiblasto y el hipoblasto. Dos días más tarde, la capa de hipoblasto ha completado el revestimiento de la superficie interna del trofoectodermo (Ponsuksili *et al.*, 2002; Maddox-Hyttel *et al.*, 2003; Goossens *et al.*, 2007; Ozawa *et al.*, 2012).

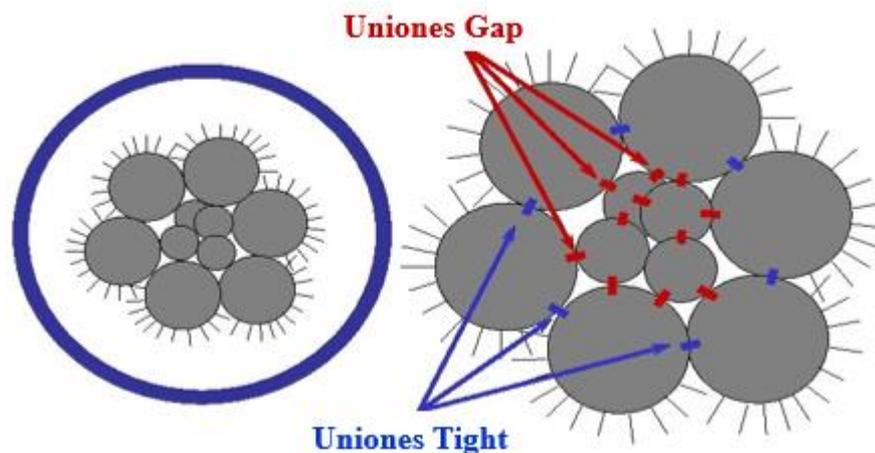


Figura 3. Polarización en el desarrollo embrionario en bovinos: uniones gap y tight. (Curso Animal Science; Parrish, 2020)

La blastulación es la transformación de una mórula a blastocisto mediante el desarrollo de una cavidad llamada blastocelo (Figura 4). Durante la blastulación, se debe formar un epitelio polarizado diferenciado para la producción y/o transporte de agua para formar el blastocelo. El transporte de iones activo a través del trofoectodermo (mediado por Na⁺-K⁺-ATPasa) es la fuerza impulsora de la acumulación de líquido que se produce durante la blastulación (Benos y Balaban, 1990; Watson, 1992; Watson y Barcroft, 2001, Barcroft *et al.*, 2004).

El movimiento del fluido a través del trofoectodermo se ve facilitado por la presencia de aquaporinas (AQP 3 y AQP 9). AQP 9 se localiza en la superficie apical del trofoectodermo y AQP 3, en la superficie basolateral del mismo, y juntos, facilitan el movimiento del fluido desde el “exterior” hacia el “interior” del blastocele, a lo largo del gradiente iónico establecido por la Na- K -ATPasa localizada basolateralmente (Barcroft *et al.*, 2003).

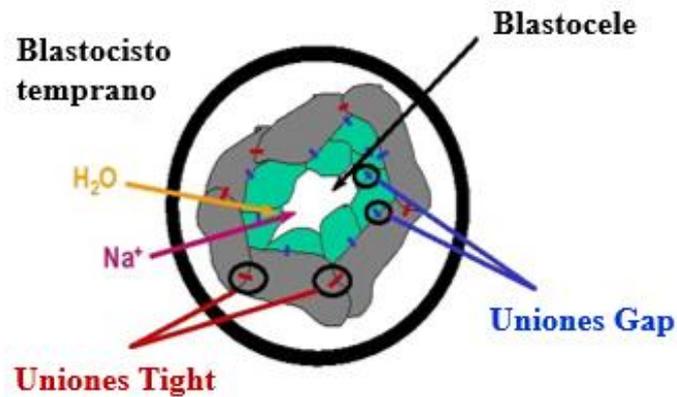


Figura 4. Formación de blastocele durante el desarrollo embrionario en bovinos (Curso Animal Science; Parrish, 2020)

2.1.4. Eclosión y elongación del blastocisto

La eclosión embrionaria es un requisito previo para que el embrión en la etapa de preimplantación se adhiera al útero e inicie la placentación (Vejlsted *et al.*, 2006). El blastocele se expande en una gran cavidad central hasta el estadio de blastocisto expandido. Posteriormente se sabe que hay tres mecanismos implicados en el proceso de eclosión de los blastocistos: las fuerzas mecánicas ejercidas sobre la zona pelúcida por la expansión del blastocisto (Cole, 1967; Massip *et al.*, 1982), el debilitamiento de la zona pelúcida por degradación enzimática (Sawada *et al.*, 1990; Berg y Menino, 1992) y la penetración de la zona pelúcida por proyecciones de células trofoectodérmicas (Gonzales *et al.*, 1996; Seshagiri *et al.*, 2009). El proceso de eclosión del blastocisto de su zona pelúcida se muestra en la (Figura 5). No existe un polo en particular por donde los embriones bovinos prefieran eclosionar, produciéndose una distribución igual entre la eclosión en el polo embrionario y el polo abembrionario (frente a la masa celular interna) (Negrón-Pérez y Hansen, 2017).

Según Vejlsted *et al.*, (2006) el desarrollo de embriones bovinos después de la eclosión incluye una compleja cascada de eventos de diferenciación celular donde ciertos compartimentos del embrión inducen a otros a diferenciarse. Estos procesos incluyen (1) la diferenciación de la masa celular interna en hipoblasto y epiblasto; (2) la eliminación del trofoblasto polar que cubre el epiblasto, lo que resulta en el establecimiento del disco embrionario; (3) la diferenciación del epiblasto a las tres capas germinales básicas, es decir, ectodermo, mesodermo y endodermo, así como a una "cuarta capa germinal", que comprende a las células germinales primordiales; y (4) la diferenciación inicial de las capas germinales, es decir, del ectodermo a ectodermo de superficie y neuroectodermo, del mesodermo a somitas y del endodermo a porciones de intestino primitivo y alantoideas. Estos eventos de diferenciación pueden clasificarse mediante estereomicroscopía en una serie de etapas que definen el desarrollo esperado.

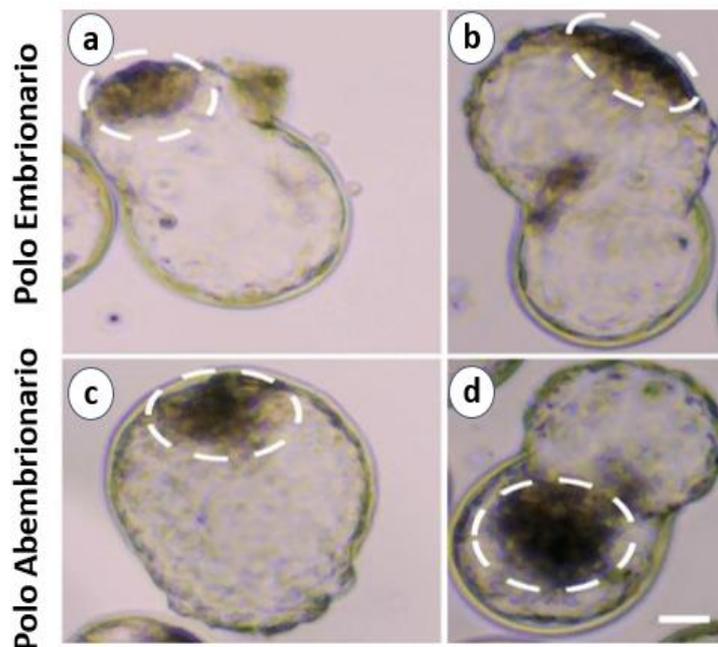


Figura 5. Imágenes de embriones bovinos que eclosionan desde la zona pelúcida a través del polo embrionario (a, b) y el polo abembrionario (c, d) (Negrón-Pérez y Hansen, 2017).

El proceso de elongación es típico en los embriones de rumiantes y es esencial para obtener un reconocimiento materno exitoso de la preñez, que tiene lugar el día 16 en embriones de bovinos y ovinos (Demmers *et al.*, 2001). Durante la etapa previa a la implantación, las células del trofoblasto se alargan y las membranas extraembrionarias se remodelan de una

forma esférica a una tubular y posteriormente a una filamentosa, como se muestra en la (Figura 6) (Turenne *et al.*, 2012; Burton *et al.*, 2016).



Figura 6. Vistas microscópicas y macroscópicas de embriones bovinos en la etapa de peri-implantación (Esférico=S, ovoide=O, tubular=T y filamentoso=F) (Turenne *et al.* 2012).

2.1.5. Reconocimiento materno-embionario

Hasta la etapa de blastocisto, el desarrollo es independiente de la señalización uterina, lo que explica la facilidad con la que se pueden producir blastocistos *in vitro*. Sin embargo, después de la eclosión de la zona pelúcida, el embrión bovino se vuelve completamente dependiente de las secreciones uterinas para su desarrollo posterior (Sánchez *et al.*, 2018). Durante la preñez temprana, la presencia del conceptus en el útero materno, pone en marcha un mecanismo antiluteolítico destinado a mantener el estado progestacional necesario para el éxito de la preñez. En rumiantes, la señal antiluteolítica es el interferón tau (IFN-t) producido por las células del trofoblasto, que además participa en el establecimiento y reconocimiento de la gestación (Figura 7) (Walker *et al.*, 2009).

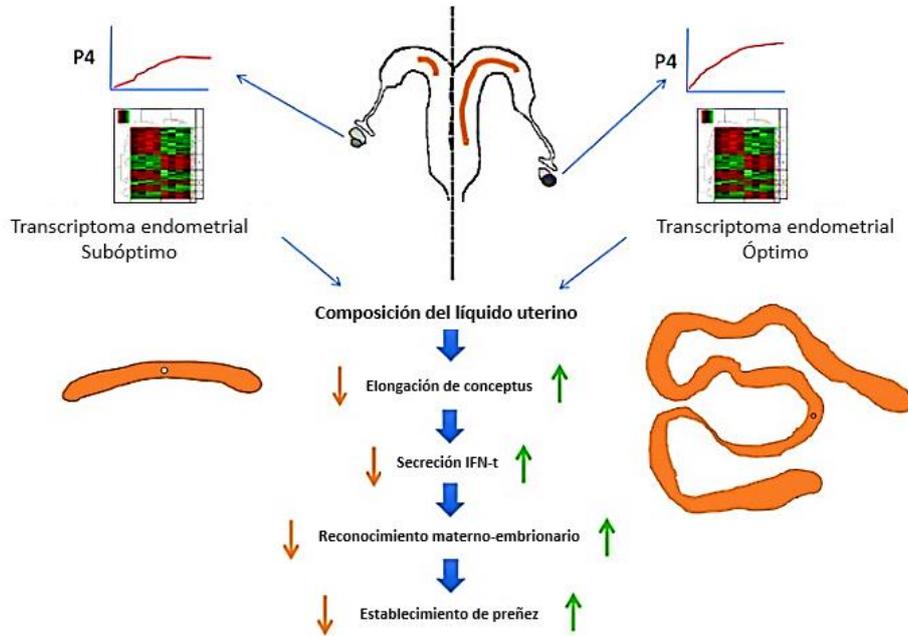


Figura 7. Relación entre las concentraciones circulantes de progesterona (P4), las alteraciones del entorno uterino y el impacto posterior en el alargamiento del conceptus y la producción de interferón-tau (IFN-t) (Forde y Lonergan, 2017).

Según Rodríguez-Alonso *et al.*, (2020) el reconocimiento materno-embriionario bovino es uno de los eventos de mayor importancia en la reproducción. Es un proceso que está regulado por múltiples señales moleculares e interacciones celulares, principalmente, entre el embrión y el cuerpo lúteo (Arosh *et al.*, 2004; Asselin *et al.*, 1997). Durante los días 15 al 17 del ciclo estral, la viabilidad embrionaria juega un papel importante para inhibir los procesos luteolíticos, favoreciendo la implantación y el mantenimiento de la gestación. Este periodo es considerado crítico para garantizar los procesos luteoprotectores (Arosh *et al.*, 2004; Tithof *et al.*, 2007; Skarzynski *et al.*, 2008), mediante la modulación de la producción de la prostaglandina F₂ alpha (PGF₂a) y prostaglandina E₂ (PGE₂), en el endometrio bovino (Fortier *et al.*, 1988; Weems *et al.*, 2006; Tithof *et al.*, 2007).

2.2. Técnicas de selección de embriones

La selección de embriones es un tema crucial para mejorar las tasas de preñez. Convencionalmente los embriones bovinos producidos *in vitro* para transferencia se evalúan morfológicamente en el día 7-8 del cultivo. Sin embargo, este método da como resultado una selección poco confiable. Por lo tanto, el reto para predecir con exactitud la competencia embrionaria, sigue siendo un tema de investigación actual (Yamagata *et al.*, 2005; Sugimura

et al., 2017). Las técnicas de selección embrionaria más usadas son: morfología, morfocinética, diagnóstico genético preimplantacional, etc.

2.2.1. Morfología

Los embriones bovinos producidos *in vivo* e *in vitro* se evalúan morfológicamente al día 7 a 8 post fecundación, siendo este el método más utilizado para la selección embrionaria (Lonergan, 2007). Los criterios para seleccionar los embriones bovinos para la transferencia se basan en la calidad y la etapa de desarrollo en el momento de la transferencia (Tabla 1) (Stringfellow y Givens, 2010). Las características morfológicas para evaluar la calidad del embrión incluyen forma, color, número y compactación de blastomeras, tamaño del espacio perivitelino, número de células extruidas y degeneradas y número y tamaño de las vesículas (Lindner y Wright, 1983; Stringfellow y Givens, 2010).

El criterio más utilizado para evaluar embriones bovinos es, haber alcanzado la etapa de blastocisto (Elsden *et al.*, 1976; Shea, 1981). El éxito de la preñez es menor con los embriones retrasados en desarrollo por más de dos días (Elsden *et al.*, 1976); aunque, Schneider *et al.*, (1980) afirman que la etapa de desarrollo del embrión parece tener poco efecto sobre la tasa de preñez y que la calidad del embrión parece ser un predictor más preciso de la preñez. Asimismo, Lindner y Wright, (1983) reportaron que los embriones de mala calidad dieron como resultado la tasa de preñez más baja, mientras que los embriones excelentes y buenos arrojaron las tasas de preñez más altas y que embriones de pobre calidad pueden producir una gestación exitosa y muchos embriones morfológicamente buenos no logran ese objetivo. Sugiriendo, que hay otros factores involucrados que no se pueden visualizar en el análisis morfológico.

La evaluación morfológica de los embriones es útil para predecir las tasas de preñez de grupos de embriones, pero tiene un valor limitado para determinar la supervivencia de embriones individuales (Lindner y Wright, 1983).

Tabla 1: Criterios morfológicos para selección de embriones según International Embryo Technology Society (IETS) (Stringfellow y Givens, 2010).

ESTADO DE DESARROLLO	
Código	Estado
1	No fertilizado
2	2 a 12 células
3	Mórula temprana
4	Mórula
5	Blastocisto temprano
6	Blastocisto
7	Blastocisto expandido
8	Blastocisto eclosionado
9	Blastocisto expandido eclosionado
CALIDAD DE EMBRIÓN	
Código	Clasificación
1	Excelente o bueno
2	Regular
3	Pobre
4	Muerto o degenerado

2.2.2. Morfocinética

El monitoreo del desarrollo embrionario mediante time-lapse es un método no invasivo que permite hacer seguimiento a detalle individualizado, por lo tanto, permite realizar una investigación básica de la morfología y los tiempos de las divisiones mitóticas en diferentes especies de mamíferos. Van Soom *et al.* (1992) fueron los primeros en reportar una relación entre el momento de la primera división y la compactación embrionaria. Además, Van Soom *et al.* (1992) reportaron que los embriones de primera división temprana tienen una mayor probabilidad de alcanzar la etapa de mórula y que la compactación temprana puede correlacionarse con una alta capacidad para desarrollarse *in vivo*. Posteriormente, varios autores informaron sobre el valor predictivo de la morfología y el momento de las divisiones mitóticas con respecto a la calidad del embrión, la competencia en el desarrollo y la tasa de blastocitos y el resultado de la preñez (Tabla 2) (Sugimura *et al.*, 2010; Dang-Nguyen *et al.*, 2010; Sugimura *et al.*, 2012).

Tabla 2. Estudios en los que se empleó la selección embrionaria por morfocinética.

	Especies	Autores
Tiempo a primera división es un indicador de la viabilidad embrionaria.	Humanos, porcinos, equinos y bovinos.	Van Soom <i>et al.</i> , 1992; Grisart <i>et al.</i> , 1994; Mateusen <i>et al.</i> , 2005; Wong <i>et al.</i> , 2010; Lewis <i>et al.</i> , 2019; Sugimura <i>et al.</i> , 2012
Velocidad de desarrollo a blastocistos sobre la tasa de preñez	Humanos y equinos	Van Montfoort <i>et al.</i> , 2004; Claes <i>et al.</i> , 2019
Tiempos de división mitótica afecta el desarrollo embrionario.	Bovinos, equinos, ovinos, porcinos y humanos.	Somfai <i>et al.</i> , 2010; Magata <i>et al.</i> , 2019; Marzano <i>et al.</i> , 2019; Salgado <i>et al.</i> , 2018; Fryc <i>et al.</i> , 2021; Mateusen <i>et al.</i> , 2005; Mandawala <i>et al.</i> , 2016.

En humanos, el monitoreo utilizando time-lapse es hoy en día una herramienta establecida para seleccionar embriones de alta calidad para la transferencia (Pribenszky *et al.*, 2010b; Wong *et al.*, 2010; Hlinka *et al.*, 2012).

En bovinos, Grisart *et al.* (1994) reportaron que los embriones que se dividieron 26 y 32 horas (h) después de la fecundación alcanzaron la etapa de blastocisto antes que los que se dividieron más tarde (36-48 h). Además, los blastocistos obtenidos al día 6 y 7 de cultivo son menos sensibles a la congelación que los embriones que alcanzaron la etapa de blastocisto a más 7 días de cultivo. La tasa de criosupervivencia fue 76% en los blastocistos al día 7 de cultivo *in vitro*, mientras que para blastocistos de 8 días se redujo a 32% (Massip *et al.*, 1995).

2.2.3. Diagnóstico genético preimplantacional

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) es una tecnología que se implementó en humanos con éxito en 1989 como una alternativa al diagnóstico prenatal en parejas con desordenes genéticos que pudieran transmitir alguna anomalía genética o cromosómica a sus hijos y ofrecer una oportunidad realista de tener hijos sanos (Harper, 2018).

A mediados de la década de 1990, fue utilizada para selección de embriones en pacientes sometidas a fecundación *in vitro*, examinando cromosomas con el objetivo de obtener mayores tasas de implantación y disminuir los abortos espontáneos (Harper, 2018). El DGP requiere técnicas de alta complejidad en la toma de muestras y conocimiento de enfermedades genéticas (Almodin *et al.*, 2005). En el diagnóstico se puede tener una eficiencia y precisión casi del 100%, sin embargo, las muestras para esta técnica son muy pequeñas, es por esto que siempre existe riesgo de errores (Takeshita y Kubo, 2004).

Almodin *et al.* (2005) afirmaron que el proceso de la biopsia embrionaria es el componente más complejo del DGP. En bovinos es más común realizar la biopsia por microdissección (Lopes *et al.*, 2001), mientras que en embriones humanos la biopsia se realiza por aspiración, que muestra menos daño al embrión (Almodin *et al.*, 2005). Seguidamente, para las pruebas genéticas, el material obtenido de la biopsia se puede analizar mediante la amplificación de secuencias específicas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Sermon 2002; Thornhill y Snow 2002).

En bovinos, el efecto de esta técnica en la calidad del embrión es poco estudiada y no existe un protocolo único que se practique para implementar el DGP (Jiménez-Macedo *et al.*, 2007). Los avances de esta técnica han permitido su integración en el sistema de protocolos de superovulación y posterior transferencia. Este método tiene un gran potencial económico, debido a que el DGP permite la selección de embriones según su sexo, además puede usarse para criar líneas especiales de bovinos mediante la selección asistida por marcadores de embriones de acuerdo con sus características de producción (Bodó *et al.*, 2001).

2.2.4. Desarrollo post eclosión

El cultivo *in vitro* posterior a la eclosión de embriones bovinos surgió como un procedimiento alternativo que podría permitir el establecimiento de una herramienta más precisa para evaluar la capacidad de desarrollo del embrión, sin la necesidad de transferirlos a receptores y manteniendo las condiciones *in vitro* similares a todos los embriones (Brandão *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2013). Además, los sistemas de desarrollo posterior a la eclosión (PHD) podrían contribuir a estudios básicos o a la investigación de la toxicidad de los

productos cultivados *in vitro*, productos farmacéuticos, pesticidas y otros productos químicos (Brandão *et al.* 2004).

Ramos-Ibeas *et al.* (2020) mostraron la posibilidad del cultivo *in vitro* de embriones bovinos después de la eclosión, logrando la elongación de los embriones bovinos producidos *in vivo* que se colocaron dentro de túneles de gel de agarosa y se cultivaron *in vitro*. Asimismo, Vajta *et al.* (2000) reportaron que los embriones producidos *in vitro* cultivados dentro de los túneles de gel de agar lograron no solo la elongación, sino también una alta tasa de supervivencia en el cultivo a largo plazo hasta el día 26.

2.3. Aplicaciones de la tecnología de embriones

Las tecnologías de embriones tradicionalmente se utilizan en el aceleramiento de la mejora genética en nuestra ganadería, siendo las más importantes:

2.3.1. Producción *in vivo* de embriones

La superovulación y la transferencia de embriones (MOET) son métodos que permiten la rápida multiplicación de animales, ya que permite la producción de más terneros por hembra a comparación de los partos naturales (Moore y Hasler, 2017). En 1890, se realizó la primera transferencia de embriones exitosa en conejos (Heape, 1891). Las primeras superovulaciones en bovinos fueron reportadas por Casida *et al.* (1943). La primera transferencia quirúrgica exitosa en bovinos fue realizada por Willet *et al.*, (1951), logrando el nacimiento de la primera cría. Posteriormente, la técnica fue simplificada por Avery *et al.* (1962) transfiriendo los embriones a la receptora en pie y por el flanco (laparotomía lateral). La primera transferencia no quirúrgica con éxito fue realizada por Mutter *et al.*, (1964) atravesando el cérvix con una pipeta de inseminación.

Una característica de la superovulación es la variabilidad en la respuesta a pesar del uso de protocolos similares. En bovinos, las respuestas oscilaron entre 0 y más de 100 estructuras recuperadas, de las cuales 0 a más de 60 eran embriones de buena calidad (Moore y Hasler, 2017). La recolección de embriones en bovinos se realizó por primera vez quirúrgicamente, este procedimiento resultó invasivo, costoso y muy laborioso. Debido a esto, se desarrollaron técnicas no quirúrgicas, ya que son más simples, fáciles y tienen un menor costo. Más tarde,

Drost *et al.* (1976), Elsdén *et al.* (1976) y Rowe *et al.* (1976) informaron sobre avances en esta técnica no quirúrgica de recuperación de embriones. A partir de entonces, sobrevino un aumento en el número de transferencias comerciales (Hasler, 2014).

En el año 2019, la Sociedad Internacional en Tecnología de Embriones (IETS) reportaron que se produjeron un total de 1.480.821 embriones transferibles. Siendo, los embriones derivados de *in vivo* con una tendencia a la reducción desde 2005, como se observa en la Figura 8 (IETS, 2020). En cuanto al origen del embrión, en el 2019, se observa que la proporción de embriones producidos *in vitro* (1, 031,769; 72,7%) superó largamente al número de embriones producidos *in vivo* (387,769; 27,3%).

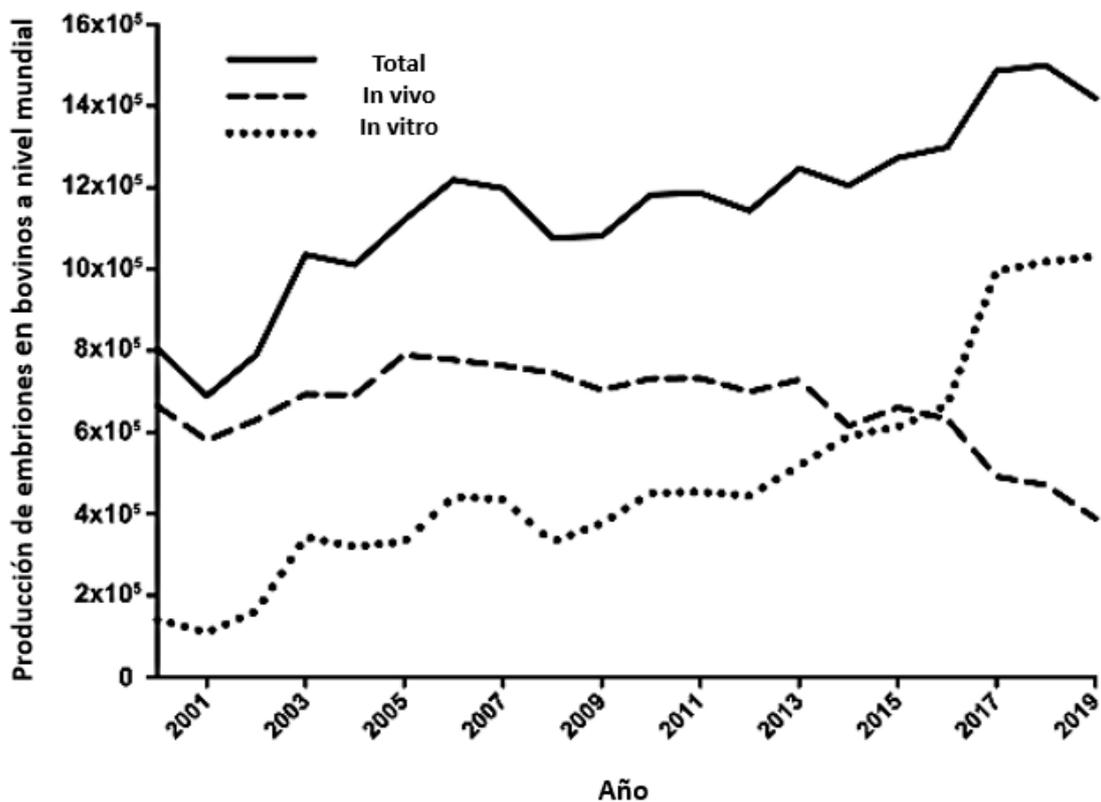


Figura 8. Número de embriones bovinos (derivados *in vivo*, producidos *in vitro*) registrados en el período 2000-2019 (IETS, 2020).

2.3.2. Producción *in vitro* de embriones

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) se desarrolló como una alternativa al MOET. La PIVE comprende una serie de procesos que incluyen la maduración *in vitro*, la fecundación *in vitro* y el cultivo *in vitro*. Estos procesos intentan simular las condiciones que

ocurren *in vivo* para proporcionar embriones de alta calidad capaces de un desarrollo e implantación continuo y que den como resultado crías viables (Meirelles *et al.*, 2004).

La maduración de los ovocitos incluye cambios nucleares y citoplasmáticos en el gameto en desarrollo. En condiciones *in vitro*, los ovocitos normalmente completarán la maduración nuclear a MII dentro de las 20 a 24 horas y luego estarán listos para la fecundación (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1987). Alrededor del 85% al 90% de los ovocitos inmaduros cultivados alcanzarán MII al final de la maduración *in vitro* (MIV) en condiciones adecuadas (Watson, 2007). La mejora de la evaluación directa de la maduración nuclear y citoplasmática por métodos no invasivos podría permitir la selección futura de los ovocitos competentes (Fulka *et al.*, 1998). Siendo los hitos que marcaron el avance de la IVF, mostrados en tabla 3.

Después de completar la MIV, los ovocitos se incuban conjuntamente con los espermatozoides durante un máximo de 18 a 24 h mientras se someten a FIV. La interacción espermatozoide-ovocito en la placa de fecundación ocurre en un microambiente controlado en temperatura, humedad y mezcla de gases (Gordon, 2003). Previo a la incubación los espermatozoides deben ser seleccionados y capacitados adquirir la capacidad de penetrar en la zona pelúcida (ZP) del ovocito (Parrish *et al.*, 1986). El número mínimo de espermatozoides requerido por ovocito no está bien definido debido a una gran variación de factores. Generalmente se usa una concentración de 1 a 2 millones de espermatozoides / ml para la FIV (Ward *et al.*, 2002). La tasa de fecundación, medida como la tasa de división a las 48 h posteriores al cultivo suele oscilar entre el 70% y el 85%. Una ventaja importante de la FIV es que requiere una pequeña cantidad de espermatozoides para fecundar los ovocitos inmaduros recuperados (De Graaf *et al.*, 2007).

En la PIVE, los ovocitos fecundados son cultivados *in vitro* durante 7 días hasta que alcanzan la etapa de blastocisto. En general, el 20-40% de los posibles cigotos cultivados alcanzarán la etapa de blastocisto (Lonergan *et al.*, 2001; Rizos *et al.*, 2008). Al alcanzar la etapa de blastocisto, estos se transfieren a receptoras o se criopreservan. Aunque, la criopreservación de embriones *in vitro* está poco recomendada, esta es una técnica estratégica que permite congelar embriones de alta calidad con la finalidad de mantener su viabilidad a la descongelación, lo que puede aumentar las tasas de preñez (Ferré *et al.*, 2019). Por otro lado, se ha propuesto que la vitrificación es un mejor método para criopreservar

embriones *in vitro* bovinos (Vajta, 2000), aunque la congelación lenta, es una técnica que está volviendo a resurgir para congelar embriones producidos *in vitro* con buenos resultados (Bruyère *et al.*, 2012).

Tabla 3: Logros históricos que revolucionaron en la producción *in vitro* de embriones.

Año	Logros
1959	Fecundación de ovocitos <i>in vitro</i> y primer nacimiento de mamífero (conejo) por embriones derivados de FIV (Chang, 1959)
1973	Criopreservación de embriones bovinos y primer reporte sobre el nacimiento de terneros por transferencia de embriones congelados-descongelados (Wilmut y Rowson, 1973a, b)
1977	Primer informe sobre FIV en ganado (Iritani y Niwa, 1977)
1981	Nacimiento de terneros vivos a partir de embriones de FIV (Brackett <i>et al.</i> , 1982)
1987	Primer reporte sobre terneros producidos únicamente por fecundación <i>in vitro</i> y embriones producidos <i>in vitro</i> (Lu <i>et al.</i> , 1987)
1988	Desarrollo del método Ovum pick-up (OPU) por aspiración transrectal guiada por ultrasonido de ovocitos en ganado (Pieterse <i>et al.</i> , 1988)
1993	Nacimiento de terneros vivos por FIV de ovocitos con espermatozoides sexados (Cran <i>et al.</i> , 1993)
1994	Desarrollo de protocolos para la producción de embriones como alternativa a MOET, combinando OPU, FIV y ET (Looney <i>et al.</i> , 1994)

La baja tasa de blastocistos (20 a 40%) 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 pudieran deberse: a una maduración incompleta de los ovocitos citoplasmáticos, a condiciones de cultivo inadecuadas que conducen a una activación del genoma embrionario deficiente o a una fragmentación del ADN (Sirard *et al.*, 2006). Además, la tasa de preñez después de la transferencia de embriones producidos *in vitro* no supera el 40% (Reichenbach *et al.*, 1992; Massip *et al.*, 1994; Van Soom *et al.*, 1994; Wurth *et al.*, 1994). Aunque, Enright *et al.*, (2000) reportaron que los embriones

producidos *in vitro* tiene similar capacidad implantatoria que los embriones producido *in vivo*.

El número de embriones producidos *in vivo* que se colectan y transfieren a nivel mundial parece haberse estabilizado en los últimos años (Figura 8), mientras que los embriones derivados y transferidos de la PIVE ha venido creciendo anualmente un promedio de 12% (Ferré *et al.*, 2019; Sirard, 2018). El número de embriones producidos *in vitro* en bovinos se mantuvo por encima de un millón de registros, lo que representa el 72,7% de todos los embriones de bovinos producidos. Se observaron una tendencia global en todas las regiones el aumento del número de embriones *in vitro* transferidos (Figura 9).

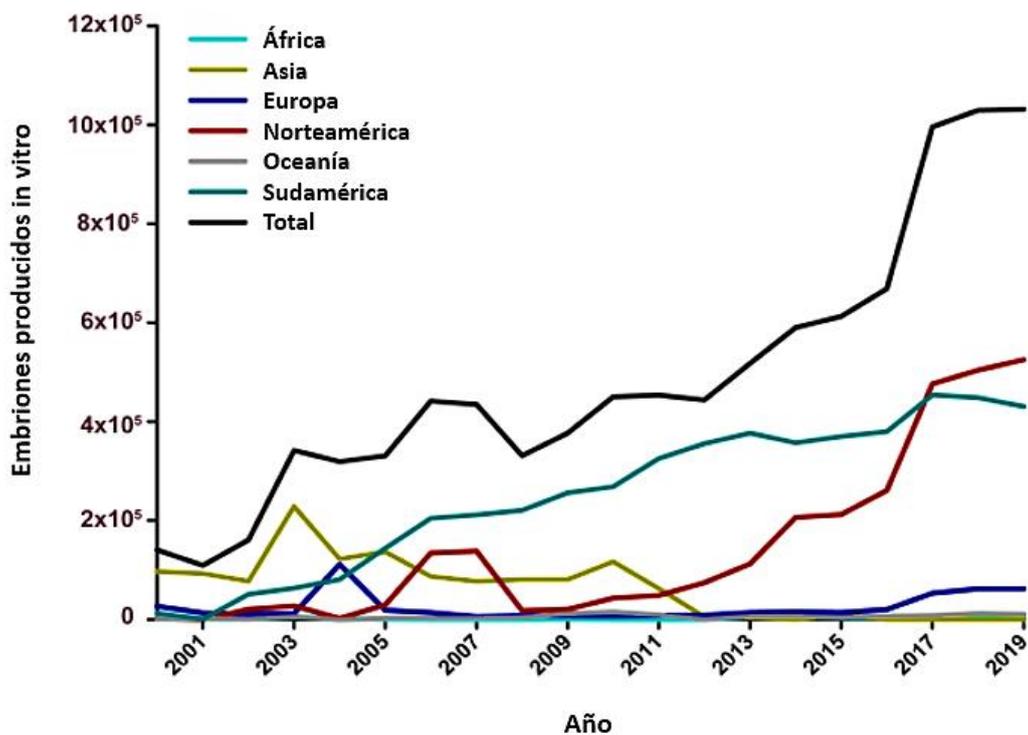


Figura 9. Número de embriones bovinos producidos *in vitro* en el período 2000-2019, por continente (IETS, 2020).

En la actualidad, se busca mejorar el rendimiento general de todas las etapas: recuperación de ovocitos, maduración *in vitro*, fecundación *in vitro*, cultivo *in vitro* para el desarrollo embrionario, la congelación de embriones, la transferencia y establecimiento de la preñez (Meirelles *et al.*, 2004; Rizos *et al.*, 2003, Ward, *et al.*, 2002; Ferré *et al.*, 2019)

Tabla 4. Investigaciones que reportan tasas de blastocistos y preñez de embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos recuperados por técnica ovum pick-up (OPU).

Ovocitos (n)	Blastocistos % (día 7)	Preñez en vacas %	Hembras nacidas %	Referencia
1773	22.2			Blondin <i>et al.</i> , 2009
1785	23.0	22	50	Raymussen, 2011
110	21.8			Sebrian-Serrano <i>et al.</i> , 2013
880	41	46	96	Morotti <i>et al.</i> , 2014
362	24.3	37.5		Sanches <i>et al.</i> , 2016
818	52.6	41.3		Do <i>et al.</i> , 2018
		55	45	Gómez <i>et al.</i> , 2020

III. METODOLOGÍA

3.1. Lugar

La presente investigación se realizó en el Centro de Investigación en Tecnología de embriones (CIETE) del PIPS en Mejoramiento Animal, Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina, ubicado en el distrito de la Molina, Lima, Perú. El laboratorio cuenta con el equipamiento y materiales necesarios para poder realizar este trabajo de investigación.

3.2. Recuperación de complejo cúmulus ovocito (COCs)

Los ovarios colectados de hembras sacrificadas, provenientes del camal Yerbateros, fueron transportados en termos. Una vez en el laboratorio los ovarios fueron lavados 2 a 3 veces con solución fisiológica de 0,9% de NaCl a 35 °C y conservados en la misma solución. Los COCs fueron aspirados de folículos de tamaño entre 3 a 8 mm con aguja 18G de 1 ½ pulgadas.

El contenido folicular fue colectado en tubos conicos de 15 mL, para luego ser filtrado y lavado con medio Lactato Ringer también atemperado a 37°C. Luego se colocó el material en placas Petri de 100 x 15mm, previamente cuadrículada la base para facilitar la búsqueda y diluida con medio Lactato Ringer suplementado con PVA y gentamicina. Los COCs fueron visualizados bajo un estereoscopio, inmediatamente transferidos a una placa de 35x 10 mm (Falcon®, 353001 Corning, USA), conteniendo medio de manipulación realizado en el laboratorio CIETE, para luego ser clasificados. Los COCs fueron evaluados por su morfología y clasificados dentro de 4 categorías: (1) completamente rodeados por ≥ 3 capas células del cúmulus con citoplasma homogéneo, (2) ovocitos parcialmente por células del cúmulus y citoplasma irregular, (3) ovocitos denudados y (4) ovocitos rodeado por fibrina, con aspecto de tela de araña. Los COCs se clasificaron como viables (calidad A y B) y no viables (calidad C y D), para los procesos de maduración y fecundación *in vitro*.

3.3. Producción de embriones *in vitro* en bovinos

3.3.1. Maduración *in vitro*

Después de la recuperación y clasificación, los COCs de calidad A y B (viables) fueron lavados en medio de manipulación y en medio de maduración MIV® (Vitrogen, Brasil). Se prepararon 2 microgotas de 70µL de medio MIV® en placas de cultivo de 35x10mm (Falcon®), las cuales fueron cubiertas con aceite mineral y equilibradas como mínimo 2 horas en la incubadora. Se colocaron 10 a 12 COCs por microgota de medio MIV® y finalmente se llevaron a la incubadora a 6% CO₂ en aire, 38,5 °C y humedad sobre 90% por 22 a 24 horas.

3.3.2. Fecundación *in vitro*

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 realizado en el laboratorio CIETE y de fecundación FIV® (Vitrogen, Brasil). Luego, fueron colocados en grupos de 10 a 12 en microgotas de 70 µL de medio de fecundación FIV® en placas Petri de 35x10 mm (Falcon®), cubiertos con aceite mineral, previamente incubados a 38.5°C y 6% CO₂ por 2 horas. Posteriormente, se adicionó una dosis de espermatozoides seleccionados y capacitados en medio FIV®. La preparación de la capacitación de los espermatozoides se realizó utilizando una pajilla de 0,5 mL de semen congelado de toros provenientes del Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Seguidamente, se descongeló en agua a 37 °C por 20 segundos. Para seleccionar y capacitar los espermatozoides se utilizó el método de Percoll 45/90, en un microtubo de 1,5 mL se colocó 400 µL de Percoll 45 (Vitrogen®, Brasil), 400 µL de Percoll 90 (Vitrogen®, Brasil) en la gradiente inferior y en la parte superior 400 µL de semen. La primera centrifugación se realizó a 3000 RPM por 6 minutos, posteriormente, se eliminó el sobrenadante y al pellet se le adicionó 400 µL de medio de fecundación FIV® (Vitrogen®, Brasil). Nuevamente se llevó a centrifugar a 3000 RPM por 3 minutos, seguidamente se procedió a analizar la cantidad y calidad de los espermatozoides del pellet para determinar la dosis espermática (10000 espermatozoides/ovocito) por microgota de fecundación que poseerán 10 a 12 ovocitos maduros. Finalmente, se llevó a la incubadora a 6% CO₂ en aire 38,5 °C y humedad sobre 90% por 18 horas.

3.3.3. Cultivo *in vitro*

Aproximadamente 18 a 20 horas post inseminación, se desnudaron los presuntos cigotos casi completamente por pipeteo en gotas de medio de manipulación y se lavaron en medio de cultivo CIV® (Vitrogen, Brasil). Posteriormente, se seleccionaron 16 posibles cigotos al azar y fueron colocados individualmente en los micropocillos de una placa Primo Vision® previamente equilibrada a 38,5°C, 6% CO₂ y 90% de humedad un día antes con medio de cultivo CIV® (Vitrogen, Brasil) y cubierta con aceite mineral; luego la placa de micropocillos fue colocada en el equipo Primo Vision TL® (Vitrolife, Suecia) y permaneció dentro de la incubadora. Los días 3 y 5 post fecundación se realizaron renovaciones del 60 % del medio.

Otro grupo (control de laboratorio) de presuntos cigotos colocados en grupos de 10 a 12 en microgota de 70 µL de medio CIV® y finalmente se llevaron a la incubadora a 6% CO₂ en aire, 38,5 °C y humedad sobre 90% hasta el día 7.5 post IVF. Los días 3 y 5 post fecundación se realizaron renovaciones del 60 % del medio.

3.4. Monitoreo del tiempo de blastulación (tSB)

Durante el cultivo *in vitro*, los presuntos cigotos fueron monitoreados individualmente (Figura 10) con el uso del equipo Primo Vision TL® (Vitrolife, Suecia) que toma imágenes cada 30 minutos desde el día 1 hasta el 7.5 post fecundación. Se registraron los tiempos de división embrionaria: t2 (h) tiempo de división a 2 células; t3 (h) tiempo de división a 3 células; t4 (h) tiempo de división a 4 células, t5 (h) tiempo de división a 5 células, t8 (h) tiempo de división a 8 células; t9+ (h) tiempo de división a más de 9 células, tM (h) tiempo al estadio de mórula; tSB (h) tiempo a la blastulación, tB (h) tiempo al estadio de blastocisto propiamente dicho y tBX (h) tiempo al estadio de blastocisto expandido. Al finalizar el monitoreo del desarrollo embrionario individual (día 7.5 post IVF), se procesó cada video para establecer los tiempos previamente mencionados (Figura 11). Además, las imágenes con medidas calibradas fueron archivadas en formato JPG, para ser procesadas con software ImageJ, para la medición de diámetros de los blastocistos en los tiempos: t2, t3, t4, t5, t8, t9+, tM, tSB, tB, tBX.


Primo Vision^{EVO}
 Time Lapse Embryo Monitoring System



Elapsed time: 3 Days, 20:20

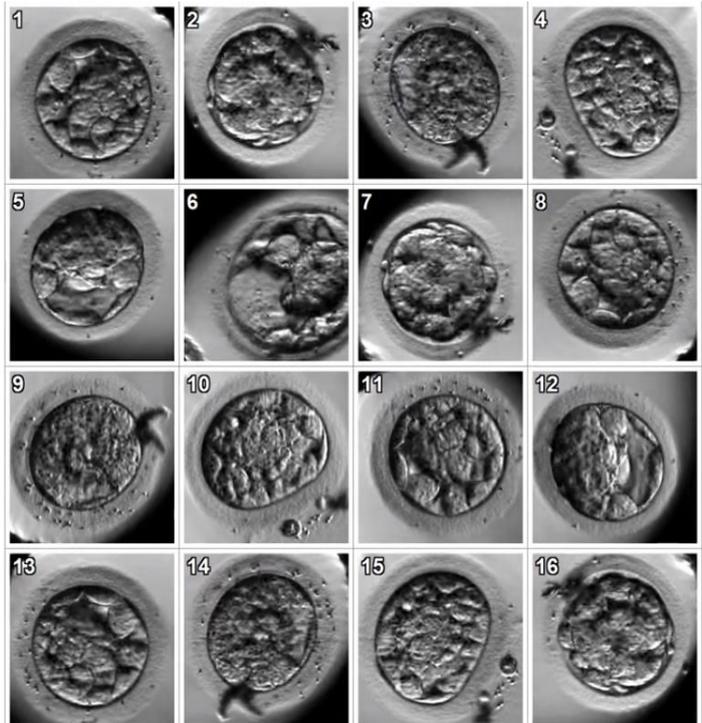


Figura 10. Sistema Primovision® para monitorear el desarrollo embrionario individual (Vitrolife, Primovision®)

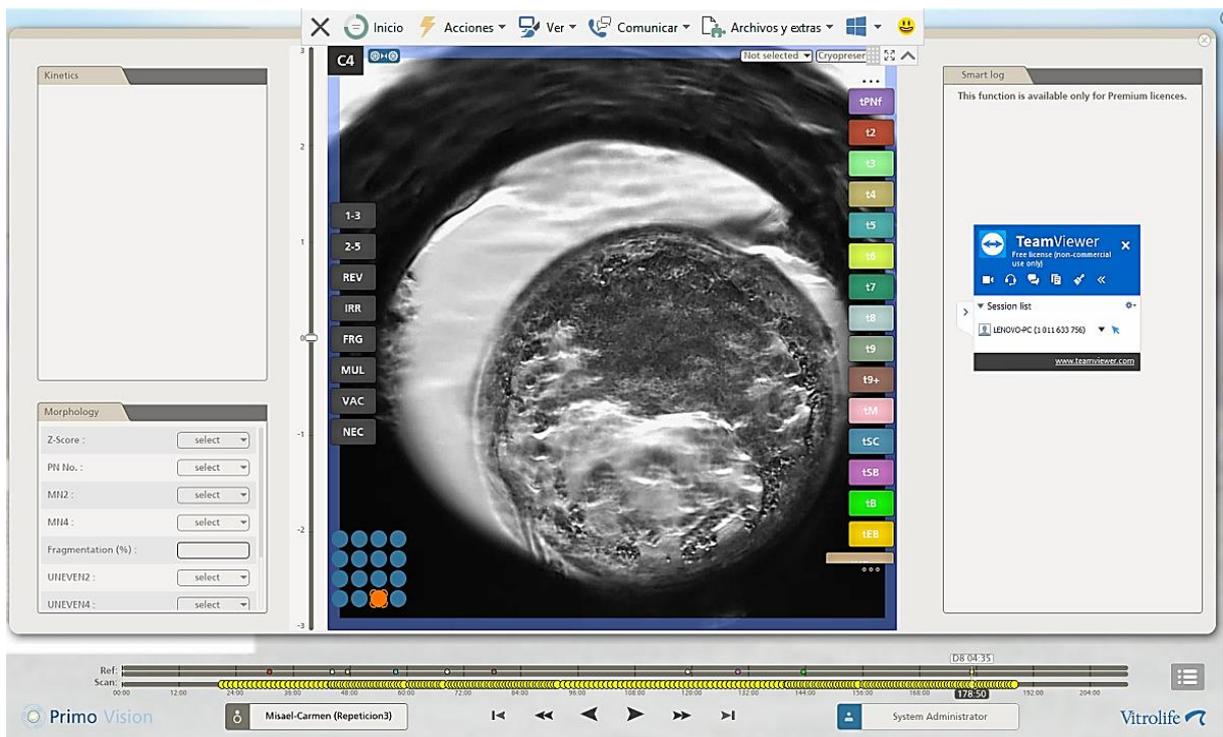


Figura 11. Imagen de blastocisto al día 7 Post IVF del un micropocillo (C4) observado con sistema time-lapse (Vitrolife, Primovision®).

3.5. Determinación de la viabilidad *in vitro* de embriones

Culminado el monitoreo del desarrollo embrionario individual, los 16 embriones en micropocillos de cada lote continuaron en cultivo *in vitro* por 48 h adicionales (día 9.5 post IVF) en las mismas condiciones *in vitro* 6% CO₂ en aire, 38,5 °C y humedad. Además, el día 7.5 se realizó la renovación del 60 % del medio de cultivo.

Al día 9.5, a los embriones se les efectuó las siguientes mediciones morfológicas: diámetro, estado de desarrollo, calidad y conteo de número de blastómeros. A partir de las imágenes calibradas del monitoreo del desarrollo embrionario fueron archivadas en formato JPG y procesada con software ImageJ para la medición de diámetros de los blastocistos.

Seguidamente, los blastocistos fueron sometidos a análisis de conteo núcleos de blastómeras, para ello los blastocistos fueron fijados individualmente en paraformaldehído 1% en tampón fosfato salino por 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, los embriones fijados se incubaron de manera individual en gotas (10 µL) atemperadas (37°C) de medio de manipulación cubiertas con aceite mineral y suplementadas con 2 µL de solución DAPI (NucBlue™ Fixed Cell ReadyProbes™ Reagent, Thermo Fisher Scientific) por 15 a 20 minutos en un ambiente oscuro para la tinción de núcleos de las blastómeras. En seguida, fueron montados en una placa portaobjetos uno a uno, luego fueron aplanados con un cubreobjetos para su evaluación usando el microscopio de fluorescencia (Axioscope, Carl Zeiss, EE. UU.) con un aumento de 100x a longitud de onda de 365 nm.

El desarrollo embrionario post eclosión (viabilidad *in vitro*) nos permitirá clasificar a los embriones como viables cuando posean un diámetro mayor a 200 µm, número de células mayor a 180, estado de desarrollo eclosionado expandido y calidad mayor que regular, y como no viables a los embriones que no cumplan estos requisitos mínimos. Finalmente, la categoría de viables y no viables (evaluada al día 9.5), nos permitió clasificar retrospectivamente según tiempo de blastulación (blastulación temprana, BT y blastulación tardía, BTA).

La blastulación temprana (BT) fue determinada como el tiempo de blastulación ocurrido por debajo del promedio general y la blastulación tardía (BTA) fue determinada como el tiempo de blastulación ocurrido por encima del promedio general. Siendo el promedio del tiempo de blastulación 149.79 h determinada en 96 blastocistos en 13 lotes de trabajo.

3.6. Grupos experimentales

Basado en el desarrollo embrionario post eclosión evaluada al día 9.5 (viables y no viables), nos permitió clasificar retrospectivamente según tiempo de blastulación (BT y BTA) en 4 grupos (Figura 12, el diseño experimental realizado).

- Grupo 1: Viable y blastulación temprana (V-BT)

Estos son blastocistos con un diámetro mayor a 200 μm , número de células mayor a 180, estado de desarrollo eclosionado expandido y calidad mayor que regular y el momento de blastulación fue menor a 149.79 h post IVF.

- Grupo 2: Viables y blastulación tardía (V-BTA)

Estos son blastocistos con un diámetro mayor a 200 μm , número de células mayor a 180, estado de desarrollo eclosionado expandido y calidad mayor que regular y el momento de blastulación fue mayor a 149.79 h post IVF.

- Grupo 3: No viables y blastulación temprana (NV-BT)

Estos son blastocistos con un diámetro inferior a 200 μm , número de células menor a 180, estado de desarrollo no eclosionado o degenerado y calidad regular o malo y el momento de blastulación fue menor a 149.79 h post IVF.

- Grupo 4: No viables y blastulación tardía (NV-BTA)

Estos son blastocistos con un diámetro inferior a 200 μm , número de células menor a 180, estado de desarrollo no eclosionado o degenerando y calidad regular o malo y el momento de blastulación fue mayor a 149.79 h post IVF.

3.7. Análisis estadístico

Las variables de tiempos de desarrollo (tSB, tB, tBX) para embriones fueron clasificados retrospectivamente a su viabilidad *in vitro* y estos fueron analizados con ANOVA. Además, las variables de blastulación (temprana y tardía) y según viabilidad *in vitro* (viable y no viable) fueron clasificadas retrospectivamente conformando 4 grupos, que fueron analizados con ANOVA y prueba de medias (test de Duncan) a un nivel de significancia de 0.05.

Para evaluar el potencial predictivo de cada variable morfocinética incluidas se determino con ROC-AUC (receiver operating characteristic curve). El análisis de la curva ROC proporcionará valores de AUC (área debajo de la curva) que están comprendidos entre 0,5 y 1 (0,90 a 1 = excelente, 0,80 a 0,90 = bueno, 0,70 a 0,80 = regular, 0,60 a 0,70 = malo, 0,50 a 0,60 = predictor malo).

La construcción del modelo matemático para seleccionar embriones con viabilidad *in vitro* basado en el tiempo de blastulación y variables morfocinéticas viables fue desarrollado utilizando la regresión logística binaria, que permite predecir la viabilidad basada en la característica dicotómica (viable = 1 y no viable = 0, como variable dependiente) y un conjunto de variables independientes que incluyeron: clasificación de la blastulación (blastulación temprana =2 y blastulación tardía= 1), momento de blastulación, diámetro al momento de blastulación, tiempo al estadio de blastocisto, diámetro del estadio de blastocisto-DtB, estadio de desarrollo al día 7.5, calidad embrionaria al día 7.5 y diámetro del blastocisto al día 7.5. El análisis de regresión logística binaria se realizó con el programa IBM SPSS Statistics versión 19 (IBM, Armonk, NY, EE. UU.).

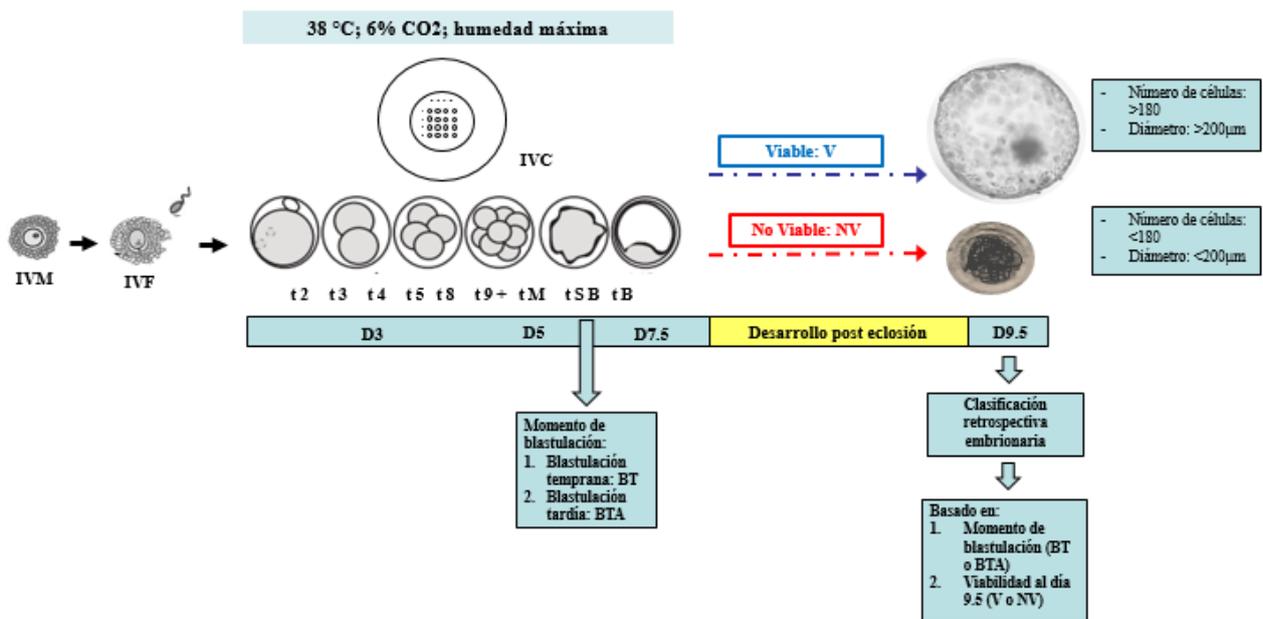


Figura 12. Esquema del diseño experimental.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Producción de embriones bovinos *in vitro* en sistema time-lapse

En este trabajo se utilizaron 923 COCs viables (calidad 1 y 2) en 13 sesiones de producción de embriones *in vitro* en bovinos (Tabla 5). El análisis ANOVA, de la variable tasa de blastocistos obtenidos al día 7.5 post IVF con el sistema time-lapse (42.8%) fue superior ($p=0.0001$) al grupo control de laboratorio (30.7%).

Tabla 5. Producción de embriones bovinos *in vitro* en sistema time-lapse y cultivo en gotas (control).

Tratamientos	Rep.	COCs Viables	Tasa de división (D3 post IVF) (x± SD)	Blastocisto % (D7.5 post IVF) (x± SD)
Grupo control	13	715	82.1± 5.2 ^a	30.7± 3.1 ^a
Sistema time-lapse	13	208	83.7± 7.0 ^a	42.8± 9.2 ^b

a,b Letras distintas en la misma columna muestran diferencias significativas ($P<0.05$).
X: Media, SD: Desviación Estándar.

En este trabajo, las tasas de clivaje medidas al día 3 post IVF fueron superiores al 70%, siendo similares a los reportados por Rizos *et al.*, (2003) 84.3%, Martins (2009) 85.7%, Sanches *et al.*, (2013) 78.8% y Bernal (2016) 70.9%. Varios investigadores reportaron que un sistema de cultivo convencional (microgotas), permite el desarrollo a blastocistos del 30% de los ovocitos madurados *in vitro* (Farin *et al.*, 2001; Mucci *et al.*, 2006; Urrego *et al.*, 2008; Presicce *et al.*, 2011), siendo estos, similares a los reportados en este trabajo. Considerando que el momento de la primera división es un indicador del potencial de desarrollo de los embriones producidos *in vitro* (Lechniak *et al.*, 2008) y este tiempo de la primera división está relacionado con el estado de poliadenilación y transcripción de genes importantes para el desarrollo embrionario temprano (Lonergan *et al.*, 2000). En bovinos (Lonergan *et al.*, 1999), cerdos (Isom *et al.*, 2012), ratones (Kobayashi *et al.*, 2004) y humanos (Fenwick *et al.*, 2002) está demostrado, que los embriones de división temprana son más competentes en el desarrollo *in vitro* que aquellos que los que dividen relativamente más tarde después de la FIV. Asimismo, en bovinos, los embriones de división temprana mostraron las siguientes características: una tasa significativamente mayor de embriones que se desarrollan hasta la etapa de blastocisto, menos

fragmentación en la etapa de mórula (Van Soom *et al.*, 1997), mayor recuento de blastómeros (Lonergan *et al.*, 2000), menor proporción de células apoptóticas (Vandaele *et al.*, 2007) y una mejor supervivencia después de la vitrificación (Dinnyés *et al.*, 1999).

Resultados similares a nuestro trabajo, fueron reportados en bovinos (Sugimura *et al.*, 2010, 2013) y humanos (Wu *et al.*, 2018) logrando tasas de blastocistos superiores a 30%, al ser cultivados en sistema time-lapse versus el sistema tradicional en microgotas. La diferencia de mayor tasa de blastocistos en el sistema time-lapse podría deberse a la menor exposición a cambios de pH, temperatura, presión osmótica e iluminación durante la revisión y evaluación del desarrollo embrionario (Zhang *et al.*, 2010). Además, el cultivo en sistema time-lapse permite la observación no invasiva de marcadores claves de desarrollo, como la extrusión de cuerpos polares, la formación de pronúcleos, los tiempos de división, la duración de ciclos celulares que pueden ser indicativos de un mayor potencial de desarrollo de blastocistos, lo cual podría influir en gran medida en la selección de embriones al ofrecer nuevas oportunidades y enfoques para los embriólogos (Kirkegaard *et al.*, 2012; Leary *et al.*, 2015).

4.2. Desarrollo embrionario post eclosión

En este experimento se utilizaron 208 (r=13) presuntos cigotos que fueron monitoreados en lotes de 16 embriones en cultivo por vez durante 7.5 días, en sistema Time-Lapse (Primovision®). Un total de 96 embriones (96/208), alcanzaron la etapa de blastulación. De ellos 38/96 fueron clasificados como viables (>200 µm y >180 conteo células) y 58/96 como no viables (<200 µm y <180 conteo células) (Tabla 6).

Tabla 6: Características de los embriones cultivados *in vitro* según viabilidad *in vitro*

Viabilidad	n	Momento de blastulación (tSB)		Estado de blastocisto (tB)		Diámetro de Blastocisto (D7.5 post IVF)
		Tiempo (h)	Diámetro (µm)	Tiempo (h)	Diámetro (µm)	Diámetro (µm)
Viables	38	142.55±7.79 ^a	155.36±4.45 ^a	159.75±8.76 ^a	168.93±7.77 ^a	209.29±17.19 ^a
No viables	58	154.54±12.92 ^b	154.81±4.60 ^a	167.91±9.95 ^b	167.21±7.53 ^a	176.35±15.02 ^b

a,b Letras distintas en la misma columna muestran diferencias significativas (P<0.05).

Es importante, tomar en cuenta que un embrión de calidad no solo es aquel que logre desarrollarse hasta estadio de blastocisto, sino que al ser transferido al útero de una receptora tenga la capacidad de mantener una buena interacción con el ambiente materno y pueda implantarse. Es por ello que durante las últimas décadas, optimizar los sistemas *in vitro* que impactan en la calidad y competencia embrionaria es un tema prioritario para laboratorios y embriólogos (Kushnir *et al.*, 2017). Asimismo, las técnicas no invasivas que incluyen la observación y clasificación morfológica o morfocinética de acuerdo al desarrollo embrionario son las más utilizadas (Fenwick *et al.*, 2002; Zollner *et al.*, 2002; Nagy *et al.*, 2003; Gianaroli *et al.*, 2003). En este experimento los embriones con viabilidad *in vitro* tienen características diferentes estadísticamente a los embriones no viables, siendo el factor clave la velocidad de inicio de blastulación (Tabla 6).

El desarrollo post eclosión (viabilidad *in vitro*) en cultivo extendido surgió como un método alternativo más preciso para evaluar la capacidad de desarrollo del embrión, sin la necesidad de ser transferido a receptoras y manteniendo las condiciones *in vitro* similares a todos los embriones (Brandão *et al.*, 2004; Vejlsted *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2013). En esta etapa de desarrollo posterior a la eclosión se puede utilizar no solo para evaluar la calidad de los embriones producidos por distintas tecnologías, sino también como modelo para estudiar la pérdida de embriones durante el período de elongación, incluido el estudio de la diferenciación celular y la placentación en estos embriones (Machado *et al.*, 2013). Por otro lado, determinar la viabilidad de los blastocistos en condiciones *in vivo* fue realizada transfiriendo embriones al día 7 y la recuperación posterior al día 14 ó 16 de desarrollo del útero de vaca (Bertolini *et al.*, 2002; Clemente *et al.*, 2009; Rodríguez-Álvarez *et al.*, 2010; Clemente *et al.*, 2011). Esta técnica invasiva puede ser más precisa para determinar la viabilidad, sin embargo, el uso de procedimientos quirúrgicos en la recuperación de los blastocistos elongados es poco repetible.

4.3. Impacto del momento de blastulación en el desarrollo embrionario *in vitro*

En este experimento se utilizaron los resultados del monitoreo en lapsos de tiempo de 208 (r=13). Un total de 96 embriones (96/208), alcanzaron la etapa de blastulación, de los cuales 49 embriones mostraron blastulación temprana (<149.79h) y 47 embriones una blastulación tardía (>149.79h) (Tabla 7).

Tabla 7. Características de los embriones cultivados *in vitro* según momento de blastulación

Momento de blastulación	N	Tiempo de blastulación (h) (x± SD)	Blastocisto % (D7.5 post IVF)		Viabilidad post eclosión (D9.5 post IVF)	
			%	Diámetro (µm)	%	Diámetro (µm)
Temprana	49	140.01±6.48 ^a	49 (100%)	204.04±19.59 ^a	31 (63.27%)	295.33±90.72 ^a
Tardía	47	159.99±8.70 ^b	47 (100%)	174.11±13.82 ^b	7 (14.89%)	273.51±86.76 ^a

^{a,b} Letras distintas en la misma columna muestran diferencias significativas (P<0.05).

Nuestros resultados muestran que la viabilidad post eclosión de embriones con blastulación temprana (63,27%; 31/49) fue superior (P<0.05) a los embriones que blastularon tardíamente (14,87%; 7/47). La blastulación es un evento esencial en el desarrollo embrionario previo a la implantación durante el cual ocurren muchos cambios moleculares y morfológicos (Watson y Barcroft, 2001; Madan *et al.*, 2005). Además, entre las etapas de mórula compacta y blastocisto, ocurre la primera diferenciación del linaje celular, formando la masa celular interna (ICM) y el trofotodermo (Rossant y Tam, 2009; Maître, 2017). Asimismo, la división temprana favorece la abundancia de transcritos en todas las etapas y aumenta la producción de blastocistos (Gutiérrez-Adán *et al.*, 2004), mientras que la blastulación temprana se ha relacionado con una mejor sincronía del desarrollo embrionario (Hoelker *et al.*, 2006; Shapiro *et al.*, 2008).

Por otro lado, el uso de tecnología time-lapse para monitoreo del desarrollo temprano, la formación y fusión pronuclear y el tiempo hasta la primera división (Fenwick *et al.*, 2002; Lemmen *et al.*, 2008; Aguilar *et al.*, 2014) es bastante común. Sin embargo, la determinación del impacto del momento de blastulación es poco estudiado (Muthukumar *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2013; Motato *et al.*, 2016). Algunos autores (Moustafa *et al.*, 2020) sostienen que el momento de la blastulación puede ser el mejor indicador para guiar la selección de embriones sobre otros componentes de clasificación morfológica individual. Asimismo, en bovinos, existen pocos reportes con respecto al momento de blastulación y su impacto en el posterior desarrollo *in vitro*.

4.4. Características de los blastocistos según viabilidad *in vitro* y momento de blastulación.

En este trabajo un total de 96 blastocistos (96/208), alcanzaron la etapa de blastulación, de los cuales 49 embriones mostraron blastulación temprana (<149.79h) y 47 embriones una blastulación tardía (>149.79h). Después de un cultivo *in vitro* extendido hasta el día 9.5, se clasificaron 31/49 (63.27%) viables (>200um y >180 conteo células) y 18/49 (36.73%) no viables (<200um y <180 conteo células); mientras que los embriones que presentaron una blastulación tardía, 7/47(14.89 %) fueron considerados viables y 40/47 (85.11%) no viables (Tabla 8).

Tabla 8. Características de los embriones cultivados *in vitro* según viabilidad *in vitro* y momento de blastulación

Momento de blastulación	N	Momento de blastulación (tSB) (x±SD)	Diámetro (tSB) (µm) (x±SD)	Tiempo al estadio blastocisto (tB) (x±SD)	Diámetro (tB) (µm) (x±SD)
V-BT	31	140.08±6.07 ^a	155.16±4.31 ^{ab}	157.70±7.93 ^a	169.12±8.26 ^a
NV-BT	18	139.90±7.31 ^a	157.65±4.31 ^a	158.36±5.92 ^a	170.76±7.41 ^a
V-BTA	7	153.46±4.46 ^b	156.20±5.32 ^{ab}	168.82±6.38 ^b	168.05±5.51 ^a
NV-BTA	40	161.13±8.79 ^c	153.53±4.18 ^b	173.11±7.53 ^b	165.28±6.96 ^a

^{a,b} Letras distintas en la misma columna muestran diferencias significativas (P<0.05).

tSB: Tiempo a la blastulación, tB: Tiempo al estadio de blastocisto propiamente dicho, V-BT: Embriones viables y con blastulación temprana, NV-BT: Embriones no viables y con blastulación temprana, V-BTA: Embriones viables y con blastulación tardía, NV-BTA: Embriones no viables y con blastulación tardía, SD: Desviación estándar.

Similares resultados a nuestro estudio se han reportado una blastulación temprana de embriones humanos en cultivo *in vitro* (40%, Wilson *et al.*, 2004; 46%, Barrenetxea *et al.*, 2005; 49.7%, Shapiro *et al.*, 2008; 40.3%, Muthukumar *et al.*, 2013), y por tanto, el uso potencial de este parámetro para mejorar la selección embrionaria es recomendada (Wong *et al.*, 2010; Campbell *et al.*, 2013; Motato *et al.*, 2016; Moustafa *et al.*, 2020).

En humanos, Desai *et al.*, (2016) afirman que la blastulación tardía y la expansión del blastocisto eran los principales predictores de los nacidos vivos. Asimismo, la blastulación tardía en humanos se correlacionó con una menor calidad del embrión. Estos hallazgos

sugieren que la predicción del rendimiento de un embrión depende en gran medida del momento de la blastulación. Así también, la tasa de implantación fue significativamente mayor para los blastocistos de blastulación temprana (50 % frente a 29 %). Moustafa *et al.*, (2020) indican que el momento de la blastulación tiene mayor correlación y valor predictivo de nacimientos vivos. Otros estudios han sugerido una correlación entre la blastulación tardía y la aneuploidía en humanos (Campbell *et al.*, 2014; Minasi *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2019). Hsieh *et al.*, (2018) enfatizan la importancia del momento de inicio de la blastulación sobre los parámetros morfológicos del blastocisto y puede proporcionar un mejor criterio para una buena selección de blastocistos. De esta manera, Soukhov *et al.*, (2022) demostraron que una blastulación temprana permitió una mayor tasa de blastocistos (84,3 % versus 60,5 %, $p < 0,0001$) que los que blastularon tardíamente. Asimismo, una blastulación temprana mostró una tasa de preñez superior que el grupo de blastulación tardía (56,4 % vs 27,0 %, $p = 0,013$).

4.5. Modelo matemático para predecir la viabilidad *in vitro* del embrión

En este trabajo, con el uso de regresión logística binaria y análisis de ROC-AUC, se construyeron modelos matemáticos para predecir viabilidad *in vitro*. En el modelo matemático-1 se incluyeron todas las variables (morfológicas y morfocinéticas). Siendo, la variable diámetro del blastocisto al día 7.5 (D7.5) la más significativa estadísticamente ($p < 0,05$) asociada con la viabilidad *in vitro* (Tabla 10 y 11). En el modelo matemático-2, se incluyeron las variables (D7.5, B, E7.5, DtSB) con valor ROC-AUC mayores a 70%. Mientras que el modelo matemático-3 consideró solo las variables significativas estadísticamente ($p < 0,05$) (D7.5) (Tabla 10). Adicionalmente, el modelo matemático-4 incluyó para parámetros del blastocisto al día 7.5 (D7.5 y DtSB) (Tabla 9) con el fin de evaluar su precisión en la selección.

Tabla 9: Modelos predictivos no invasivos de viabilidad *in vitro* con el uso de regresión logística binaria.

Variab les	Modelo-1 (todas las variables)	Modelo-2 (D7.5, B, E7.5, DtSB)	Modelo-3 (D7.5)	Modelo-4 (D7.5, DtSB)
Constante	-148.508	-51.492	-24.362	-18.424
<u>Cinética del blastocisto</u>				
Blastulación (B) (temprana=2, tardía=1)	25.898	22.592	--	--
Tiempo a la blastulación (tSB)	0.112	--	--	--
Tiempo al estadio de blastocisto (tB)	0.174	--	--	--
<u>Morfología de blastocisto</u>				
Diámetro al momento de blastulación (DtSB)	0.301	0.067	--	-0.041
Diámetro del blastocisto (DtB)	-0.107	--	--	--
Estadio de desarrollo al día 7.5 (E7.5)	-0.015	-1.318	--	--
Calidad de embrión al día 7.5 (Q7.5)	-0.872	--	--	--
Diámetro del embrión al día 7.5 (D7.5)	0.246	0.134	0.125	0.127
<u>Poder predictivo del algoritmo</u>				
Exactitud del modelo (ROC-AUC) AUC: 0,90 a 1 = excelente modelo	0.992	0.979	0.920	0.923
Omnibus tests de coeficientes y modelo, Significativo <0,01	0.000	0.000	0.000	0.000

Tabla 10: Parámetros de regresión logística del Modelo-1 para predecir la viabilidad *in vitro*

Variab les	B	95% CI de OR	P valor
Constante	-148.508		0.978
<u>Cinética del blastocisto</u>			
Blastulación (B) (temprana=2, tardía=1)	25.898	0.000	0.996
Tiempo a la blastulación (tSB)	0.112	0.903 – 1.385	0.305
Tiempo al estadio de blastocisto (tB)	0.174	0.914 – 1.551	0.197
<u>Morfología de blastocisto</u>			
Diámetro al momento de blastulación (DtSB)	0.301	0.960 – 1.902	0.085
Diámetro del blastocisto (DtB)	-0.107	0.730 – 1.105	0.310
Estadio de desarrollo al día 7.5 (E7.5)	-0.015	0.049 – 19.786	0.992
Calidad de embrión al día 7.5 (Q7.5)	-0.872	0.023 – 7.670	0.557
Diámetro del embrión al día 7.5 (D7.5)	0.246	1.010 – 1.619	0.041

Coefficiente de regresión (B), razón de probabilidades (OR), Intervalo de confianza (95% CI de OR).

En el modelo matemáticos 1, 2, 3 y 4 mostraron el valor ROC-AUC alto >0.92 (Tabla 9).

Siendo la ecuación lineal del modelo-1, constituida con cinco variables:

$$P(\text{logit}) = -148.508 + (25.898) * B + (0.112) * tSB + (0.301) * DtSB + (0.174) * tB + (-0.107) * DtB + (-0.015) * E75 + (-0.872) * Q75 + (0.246) * D75$$

Para estimar la probabilidad:

Donde:

Si. $p > 0.5$, Predice, competencia embrionaria

$p < 0.5$, Predice, no competencia embrionaria

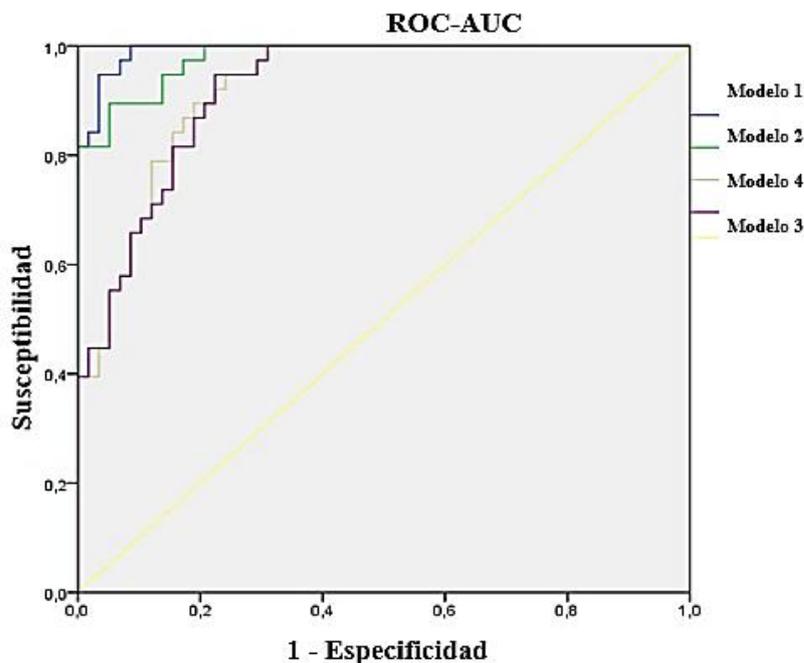


Figura 13. Valor de precisión ROC-AUC de los modelos matemáticos para predecir viabilidad *in vitro*. Modelo 1, incluyó todas las variables (B, tSB, tB, DtSB, DtB, E7.5, Q7.5, D7.5); modelo 2, incluyó las variables D7.5, B, E7.5, DtSB; modelo 3, incluyó la variable D7.5, modelo 4, incluyó las variables D7.5 y DtSB.

En humanos, analizaron la predicción de evaluación morfocinética embrionaria (sistema time-lapse) la implantación, mostraron resultados de modelos matemáticos combinados con menos precisión que los mostrados en este trabajo, ROC-AUC de 0.7 (Swain, 2013), 0.602 (Motato *et al.*, 2016), 0.70 (Milewsky *et al.*, 2015) y 0.71 (Milewsky *et al.*, 2017). Pero, el valor de ROC-AUC descendió a 0.561, cuando solo incluía los parámetros de morfología de blastocitos para predecir la implantación (Motato *et al.*, 2016). Sin embargo, los modelos que consideran variables morfocinéticas son muy útiles para predecir la formación del blastocito (ROC-AUC de 0.849). Por otro lado, Alpha Executive y ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011), propusieron un sistema de evaluación morfológica de blastocistos basado en la combinación de criterios de estado de desarrollo y calidad. Aun así, los modelos predictivos

basados en parámetros morfológicos tienen baja precisión (ROC-AUC de 0,55) para predecir una gestación exitosa (Seli *et al.*, 2011).

En bovinos, se ha realizado algunos trabajos para predecir la capacidad de preñez o implantación en relación con los parámetros morfológicos y el momento de la primera división embrionaria (Holm *et al.*, 1998; Lequarre *et al.*, 2003; Kaith *et al.*, 2015), aunque los resultados son variables y poco contradictorios. Holm *et al.*, (1998) afirman que el sistema time-lapse es un método superior para estudiar la cinética embrionaria en bovinos y seleccionar embriones con alta probabilidad de ser competentes (63 a 80%). Por otro lado, Mellisho *et al.*, (2019) utilizaron modelos matemáticos combinando variables morfológicas y morfocinéticas del embrión (momento de blastulación, estado de desarrollo, calidad y diámetro del blastocisto al día 7.5) para predecir la viabilidad *in vitro*, el cual mostró como valor ROC-AUC de 0.724; este estudio demostró que el momento de blastulación afecta el desarrollo de los blastocistos en el diámetro y calidad al día 7.5 y la viabilidad *in vitro*.

Los estudios retrospectivos iniciales que utilizan tecnología time-lapse han generado una serie de parámetros morfocinéticos para la selección de embriones viables. Estos incluyen la duración de la primera división de 1 a 2 células, tiempo entre la división de 2 a 3 células, tiempo entre la división de 3 a 4 células, patrones de ciclo de divisiones uniformes con intervalos cortos en la etapa de 3 y 5 células, y abrupta primera división celular en tres o más células (Meseguer *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2010). En humanos, algunos estudios informan una mejoría en los resultados clínicos cuando se utilizan modelos predictivos morfocinéticos para seleccionar embriones para la transferencia (Meseguer, ESHRE 2012), aunque los resultados son aún controversiales con otros reportes (Wong *et al.*, 2010; Kirkegaard *et al.*, 2012; Muñoz *et al.*, 2012).

V. CONCLUSIONES

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

- El momento de la blastulación y diámetro del blastocisto al día 7.5 nos da una alta precisión (ROC-AUC >0.9) en la selección de embriones con viabilidad *in vitro*.
- El modelo matemático-1, generado por regresión logística binaria que incluyó todas las variables, morfocinéticas, mejoró la precisión de la predicción de viabilidad e 99.2%.
- El sistema time-lapse permite una evaluación objetiva y ayuda a discriminar embriones con viabilidad *in vitro*.

VI. RECOMENDACIONES

- Ampliar este trabajo de investigación con resultados de preñez de hembras receptoras transferidas embriones con variables morfocinéticas del monitoreo de desarrollo temprano.
- Aplicar esta tecnología de monitoreo continuo en otras especies con fines de investigación para caracterizar y seleccionar embriones transferibles.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abe, K. I., Funaya, S., Tsukioka, D., Kawamura, M., Suzuki, Y., Suzuki, M. G., Schultz, R. M., & Aoki, F. (2018). Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(29), E6780–E6788. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804309115>
2. Aguilar, J., Motato, Y., Escribá, M. J., Ojeda, M., Muñoz, E., & Meseguer, M. (2014). The human first cell cycle: impact on implantation. *Reproductive biomedicine online*, *28*(4), 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.11.014>
3. Almodin, C. G., Moron, A. F., Kulay, L., Jr, Minguetti-Câmara, V. C., Moraes, A. C., & Torloni, M. R. (2005). A bovine protocol for training professionals in preimplantation genetic diagnosis using polymerase chain reaction. *Fertility and sterility*, *84*(4), 895–899. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.02.051>
4. Alomar, M., Tasiaux, H., Remacle, S., George, F., Paul, D., & Donnay, I. (2008). Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. *Animal reproduction science*, *107*(1-2), 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.06.009>
5. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human reproduction (Oxford, England)*, *26*(6), 1270–1283. <https://doi.org/10.1093/humrep/der037>
6. Arosh, J. A., Banu, S. K., Kimmins, S., Chapdelaine, P., Maclaren, L. A., & Fortier, M. A. (2004). Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E₂. *Endocrinology*, *145*(11), 5280–5293. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0587>
7. Asselin, E., Lacroix, D., & Fortier, M. A. (1997). IFN-tau increases PGE₂ production and COX-2 gene expression in the bovine endometrium in vitro. *Molecular and cellular endocrinology*, *132*(1-2), 117–126. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(97\)00128-7](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(97)00128-7)
8. Avery, T. L., & Graham, E. F. (1962). Investigations associated with the transplantation of bovine ova. III. Recovery and fertilization. *Journal of reproduction and fertility*, *3*, 218–228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0030218>

9. Bachvarova R. (1985). Gene expression during oogenesis and oocyte development in mammals. *Developmental biology (New York, N.Y.: 1985)*, 1, 453–524. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6814-8_11
10. Barcroft, L. C., Offenberg, H., Thomsen, P., & Watson, A. J. (2003). Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. *Developmental biology*, 256(2), 342–354. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(02\)00127-6](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(02)00127-6)
11. Barcroft, L. C., Moseley, A. E., Lingrel, J. B., & Watson, A. J. (2004). Deletion of the Na/K-ATPase alpha1-subunit gene (*Atp1a1*) does not prevent cavitation of the preimplantation mouse embryo. *Mechanisms of development*, 121(5), 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.04.005>
12. Barrenetxea, G., López de Larruzea, A., Ganzabal, T., Jiménez, R., Carbonero, K., & Mandiola, M. (2005). Blastocyst culture after repeated failure of cleavage-stage embryo transfers: a comparison of day 5 and day 6 transfers. *Fertility and sterility*, 83(1), 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.06.049>
13. Benos, D. J., & Balaban, R. S. (1990). Current topic: transport mechanisms in preimplantation mammalian embryos. *Placenta*, 11(5), 373–380. [https://doi.org/10.1016/s0143-4004\(05\)80213-9](https://doi.org/10.1016/s0143-4004(05)80213-9)
14. Berg, D. A., & Menino, A. R., Jr (1992). Bovine embryos produce a urokinase-type plasminogen activator. *Molecular reproduction and development*, 31(1), 14–19. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080310104>
15. Bernal, B. (2016). Influencia de la suplementación del medio de maduración y de cultivo en la supervivencia a la criopreservación de embriones bovinos in vitro. Universidad de Córdoba.
16. Bertolini, M., Beam, S. W., Shim, H., Bertolini, L. R., Moyer, A. L., Famula, T. R., & Anderson, G. B. (2002). Growth, development, and gene expression by *in vivo*- and *in vitro*-produced day 7 and 16 bovine embryos. *Molecular reproduction and development*, 63(3), 318–328. <https://doi.org/10.1002/mrd.90015>
17. Bodó, S., Baranyai, B., Gócza, E., Dohy, J., & Markkula, M. (2001). Preimplantation genetic diagnosis in cattle: a review. *Acta veterinaria Hungarica*, 49(1), 99–109. <https://doi.org/10.1556/004.49.2001.1.12>
18. Borini, A., Sciajno, R., Bianchi, V., Sereni, E., Flamigni, C., & Coticchio, G. (2006). Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing

- a high sucrose concentration. *Human reproduction (Oxford, England)*, 21(2), 512–517. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei346>
19. Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F., & Dressel, M. A. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of reproduction*, 27(1), 147–158. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.1.147>
 20. Brandão, D. O., Maddox-Hyttel, P., Løvendahl, P., Rumpf, R., Stringfellow, D., & Callesen, H. (2004). Post hatching development: a novel system for extended in vitro culture of bovine embryos. *Biology of reproduction*, 71(6), 2048–2055. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.025916>
 21. Brevini, T. A., Lonergan, P., Cillo, F., Francisci, C., Favetta, L. A., Fair, T., & Gandolfi, F. (2002). Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. *Molecular reproduction and development*, 63(4), 510–517. <https://doi.org/10.1002/mrd.10191>
 22. Bruyère, P., Baudot, A., Guyader-Joly, C., Guérin, P., Louis, G., & Buff, S. (2012). Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. *Theriogenology*, 78(6), 1294–1302. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.025>
 23. Burton, G. J., Fowden, A. L., & Thornburg, K. L. (2016). Placental Origins of Chronic Disease. *Physiological reviews*, 96(4), 1509–1565. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2015>
 24. Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M., & Hickman, C. F. (2013). Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reproductive biomedicine online*, 26(5), 477–485. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.02.006>
 25. 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>
 26. Chang, M. (1959). Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature*, 184(Suppl 7), 466–467. <https://doi.org/10.1038/184466a0>
 27. Claes, A., Cuervo-Arango, J., van den Broek, J., Galli, C., Colleoni, S., Lazzari, G., Deelen, C., Beitsma, M., & Stout, T. A. (2019). Factors affecting the likelihood of

- pregnancy and embryonic loss after transfer of cryopreserved in vitro produced equine embryos. *Equine veterinary journal*, 51(4), 446–450. <https://doi.org/10.1111/evj.13028>
28. Clemente, M., de La Fuente, J., Fair, T., Al Naib, A., Gutierrez-Adan, A., Roche, J. F., Rizos, D., & Lonergan, P. (2009). Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium?. *Reproduction (Cambridge, England)*, 138(3), 507–517. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0152>
 29. 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>
 30. Cole R. J. (1967). Cinemicrographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. *Journal of embryology and experimental morphology*, 17(3), 481–490.
 31. Coticchio, G., Lagalla, C., Sturmey, R., Pennetta, F., & Borini, A. (2019). The enigmatic morula: mechanisms of development, cell fate determination, self-correction and implications for ART. *Human reproduction update*, 25(4), 422–438. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz008>
 32. Dang-Nguyen, T. Q., Kikuchi, K., Somfai, T., Ozawa, M., Nakai, M., Maedomari, N., Viet-Linh, N., Kanai, Y., Nguyen, B. X., & Nagai, T. (2010). Evaluation of developmental competence of in vitro-produced porcine embryos based on the timing, pattern and evenness of the first cleavage and onset of the second cleavage. *The Journal of reproduction and development*, 56(6), 593–600. <https://doi.org/10.1262/jrd.10-038m>
 33. De Graaf, S. P., Beilby, K., O'Brien, J. K., Osborn, D., Downing, J. A., Maxwell, W. M., & Evans, G. (2007). Embryo production from superovulated sheep inseminated with sex-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology*, 67(3), 550–555. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.002>
 34. Demmers, K. J., Derecka, K., & Flint, A. (2001). Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction (Cambridge, England)*, 121(1), 41–49. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210041>
 35. Desai, N., Ploskonka, S., Goodman, L., Attaran, M., Goldberg, J. M., Austin, C., & Falcone, T. (2016). Delayed blastulation, multinucleation, and expansion grade are independently associated with live-birth rates in frozen blastocyst transfer cycles. *Fertility and sterility*, 106(6), 1370–1378. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.1095>

36. 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)
37. Downs, S. M., Ya, R., & Davis, C. C. (2010). Role of AMPK throughout meiotic maturation in the mouse oocyte: evidence for promotion of polar body formation and suppression of premature activation. *Molecular reproduction and development*, 77(10), 888–899. <https://doi.org/10.1002/mrd.21229>
38. Drost M., Brand A., Aarts M. (1976). A device for nonsurgical recovery of bovine embryos. *Theriogenology*, 6(5), 503-507. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(76\)90117-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(76)90117-5).
39. Elsdén, R. P., Hasler, J. F., & Seidel, G. E., Jr (1976). Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology*, 6(5), 523–532. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(76\)90120-5](https://doi.org/10.1016/0093-691x(76)90120-5)
40. Enright, B. P., Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Ward, F. A., Yang, X., & Boland, M. P. (2000). Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*, 54(5), 659–673. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00381-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00381-2)
41. Farin, P. W., Britt, J. H., Shaw, D. W., & Slenning, B. D. (1995). Agreement among evaluators of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Theriogenology*, 44(3), 339–349. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(95\)00189-f](https://doi.org/10.1016/0093-691x(95)00189-f)
42. Farin, P. W., Slenning, B. D., & Britt, J. H. (1999). Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Theriogenology*, 52(4), 659–670. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00160-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00160-0)
43. Farin, P. W., Crosier, A. E., & Farin, C. E. (2001). Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*, 55(1), 151–170. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00452-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00452-0)
44. Fenwick, J., Platteau, P., Murdoch, A. P., & Herbert, M. (2002). Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos *in vitro*. *Human reproduction (Oxford, England)*, 17(2), 407–412. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.2.407>
45. Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive

- biotechnology history and methods. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 14(5), 991–1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
46. Fleming, T. P., & Pickering, S. J. (1985). Maturation and polarization of the endocytotic system in outside blastomeres during mouse preimplantation development. *Journal of embryology and experimental morphology*, 89, 175–208.
 47. Forde, N., & Lonergan, P. (2017). Interferon-tau and fertility in ruminants. *Reproduction (Cambridge, England)*, 154(5), F33–F43. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0432>
 48. Fortier, M. A., Guilbault, L. A., & Grasso, F. (1988). Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows. *Journal of reproduction and fertility*, 83(1), 239–248. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0830239>
 49. Fryc, K., Nowak, A., Kij, B., Kochan, J., Bartlewski, P. M., & Murawski, M. (2021). Timing of cleavage divisions determined with time-lapse imaging is linked to blastocyst formation rates and quality of in vitro-produced ovine embryos. *Theriogenology*, 159, 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.031>
 50. Gad, A., Besenfelder, U., Rings, F., Ghanem, N., Salilew-Wondim, D., Hossain, M. M., Tesfaye, D., Lonergan, P., Becker, A., Cinar, U., Schellander, K., Havlicek, V., & Hölker, M. (2011). Effect of reproductive tract environment following controlled ovarian hyperstimulation treatment on embryo development and global transcriptome profile of blastocysts: implications for animal breeding and human assisted reproduction. *Human reproduction (Oxford, England)*, 26(7), 1693–1707. <https://doi.org/10.1093/humrep/der110>
 51. Gianaroli, L., Magli, M. C., Ferraretti, A. P., Fortini, D., & Grieco, N. (2003). Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertility and sterility*, 80(2), 341–349. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(03\)00596-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(03)00596-x)
 52. Gómez, E., Carrocera, S., Martín, D., Pérez-Jánez, J. J., Prendes, J., Prendes, J. M., Vázquez, A., Murillo, A., Gimeno, I., & Muñoz, M. (2020). Efficient one-step direct transfer to recipients of thawed bovine embryos cultured in vitro and frozen in chemically defined medium. *Theriogenology*, 146, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.056>
 53. Gonzales, D. S., Jones, J. M., Pinyopummintr, T., Carnevale, E. M., Ginther, O. J., Shapiro, S. S., & Bavister, B. D. (1996). Trophectoderm projections: a potential means for locomotion, attachment and implantation of bovine, equine and human

- blastocysts. *Human reproduction (Oxford, England)*, *11*(12), 2739–2745. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019201>
54. Goossens, K., Van Soom, A., Van Poucke, M., Vandaele, L., Vandesompele, J., Van Zeveren, A., & Peelman, L. J. (2007). Identification and expression analysis of genes associated with bovine blastocyst formation. *BMC developmental biology*, *7*, 64. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-64>
 55. 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*(1-2), 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.05.016>
 56. Grisart, B., Massip, A., & Dessy, F. (1994). Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *Journal of reproduction and fertility*, *101*(2), 257–264. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1010257>
 57. Gutiérrez-Adán, A., Rizos, D., Fair, T., Moreira, P. N., Pintado, B., de la Fuente, J., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2004). Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured *in vivo* or *in vitro*. *Molecular reproduction and development*, *68*(4), 441–448. <https://doi.org/10.1002/mrd.20113>
 58. Halstead, M. M., Ma, X., Zhou, C., Schultz, R. M., & Ross, P. J. (2020). Chromatin remodeling in bovine embryos indicates species-specific regulation of genome activation. *Nature communications*, *11*(1), 4654. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18508-3>
 59. Handyside A. H. (1980). Distribution of antibody- and lectin-binding sites on dissociated blastomeres from mouse morulae: evidence for polarization at compaction. *Journal of embryology and experimental morphology*, *60*, 99–116.
 60. Harper J. C. (2018). Preimplantation genetic screening. *Journal of medical screening*, *25*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1177/0969141317691797>
 61. Hasler J. F. (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, *81*(1), 152–169. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010>
 62. Heape, W. (1891). Preliminary Note on the Transplantation and Growth of Mammalian Ova within A Uterine Foster Mother. *Proceedings of the Royal Society*, *48*, 457–459. <http://dx.doi.org/10.1098/rspl.1890.0053>

63. Hlinka, D., Kařatová, B., Uhrinová, I., Dolinská, S., Rutarová, J., Rezáčová, J., Lazarovská, S., & Dudáš, M. (2012). Time-lapse cleavage rating predicts human embryo viability. *Physiological research*, *61*(5), 513–525. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932287>
64. Ho J., Arrach N., Rhodes-Long K., Salem W., McGinnis L., Chung, K., Bendikson K., Paulson R., Ahmady, A. (2018). Blastulation timing is associated with differential mitochondrial content in euploid embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *35*(4), 711–720. doi:10.1007/s10815-018-1113-9
65. Holm, P., Shukri, N. N., Vajta, G., Booth, P., Bendixen, C., & Callesen, H. (1998). Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. *Theriogenology*, *50*(8), 1285–1299. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00227-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00227-1)
66. Hoelker, M., Schmoll, F., Schneider, H., Rings, F., Gilles, M., Tesfaye, D., Jennen, D., Tholen, E., Griese, J., & Schellander, K. (2006). Bovine blastocyst diameter as a morphological tool to predict embryo cell counts, embryo sex, hatching ability and developmental characteristics after transfer to recipients. *Reproduction, fertility, and development*, *18*(5), 551–557. <https://doi.org/10.1071/rd05149>
67. Hsieh, C. E., Lee, R. K., Sun, F. J., Li, R. S., Lin, S. Y., Lin, M. H., & Hwu, Y. M. (2018). Early blastulation (EB) of day 4 embryo is predictive of outcomes in single embryo transfer (SET) cycles. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, *57*(5), 705–708. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.08.016>
68. Hwang, S. Y., Oh, B., Knowles, B. B., Solter, D., & Lee, J. S. (2001). Expression of genes involved in mammalian meiosis during the transition from egg to embryo. *Molecular reproduction and development*, *59*(2), 144–158. <https://doi.org/10.1002/mrd.1017>
69. International Embryo Technology Society. (IETS). (2020). Certificate of Embryo Recovery / Certificate of Embryo Transfer. Recuperado de https://www.iets.org/pdf/FreezeCode/iets4_AB.pdf
70. Iritani, A., & Niwa, K. (1977). Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *Journal of reproduction and fertility*, *50*(1), 119–121. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0500119>
71. Isom, S. C., Li, R. F., Whitworth, K. M., & Prather, R. S. (2012). Timing of first embryonic cleavage is a positive indicator of the in vitro developmental potential of porcine embryos derived from in vitro fertilization, somatic cell nuclear transfer and

- parthenogenesis. *Molecular reproduction and development*, 79(3), 197–207. <https://doi.org/10.1002/mrd.22013>
72. Iwata, H., Shiono, H., Kon, Y., Matsubara, K., Kimura, K., Kuwayama, T., & Monji, Y. (2008). Effects of modification of in vitro fertilization techniques on the sex ratio of the resultant bovine embryos. *Animal reproduction science*, 105(3-4), 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.03.006>
 73. Jiménez-Macedo, A. R., Paramio, M. T., Anguita, B., Morato, R., Romaguera, R., Mogas, T., & Izquierdo, D. (2007). Effect of ICSI and embryo biopsy on embryo development and apoptosis according to oocyte diameter in prepubertal goats. *Theriogenology*, 67(8), 1399–1408. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.003>
 74. Johnson, M. H., & McConnell, J. M. (2004). Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, 15(5), 583–597. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2004.04.002>
 75. Kaing, A., Kroener, L. L., Tassin, R., Li, M., Liu, L., Buyalos, R., Hubert, G., & Shamonki, M. (2018). Earlier day of blastocyst development is predictive of embryonic euploidy across all ages: essential data for physician decision-making and counseling patients. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(1), 119–125. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-1038-8>
 76. Kaith, S., Saini, M., Raja, A. K., Sahare, A. A., Jyotsana, B., Madheshiya, P., Palta, P., Chauhan, M. S., Manik, R. S., & Singla, S. K. (2015). Early cleavage of handmade cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos is an indicator of their developmental competence and quality. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 50(2), 214–220. <https://doi.org/10.1111/rda.12472>
 77. Kirkegaard, K., Agerholm, I. E., & Ingerslev, H. J. (2012). Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27(5), 1277–1285. <https://doi.org/10.1093/humrep/des079>
 78. Kubiak, J. Z., Bazile, F., Pascal, A., Richard-Parpaillon, L., Polanski, Z., Ciemerych, M. A., & Chesnel, F. (2008). Temporal regulation of embryonic M-phases. *Folia histochemica et cytobiologica*, 46(1), 5–9. <https://doi.org/10.2478/v10042-008-0001-z>
 79. Kushnir, V. A., Barad, D. H., Albertini, D. F., Darmon, S. K., & Gleicher, N. (2017). Systematic review of worldwide trends in assisted reproductive technology 2004–2013. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 15(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0225-2>

80. 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)
81. Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., Northey, D. L., & First, N. L. (1987). Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. *Biology of reproduction*, 36(2), 376–383. <https://doi.org/10.1095/biolreprod36.2.376>
82. Lemmen, J. G., Agerholm, I., & Ziebe, S. (2008). Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reproductive biomedicine online*, 17(3), 385–391. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60222-2](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60222-2)
83. Lequarre, A. S., Marchandise, J., Moreau, B., Massip, A., & Donnay, I. (2003). Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. *Biology of reproduction*, 69(5), 1707–1713. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017178>
84. 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>
85. Lindner, G. M., & Wright, R. W., Jr (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20(4), 407–416. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(83\)90201-7](https://doi.org/10.1016/0093-691x(83)90201-7)
86. 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>
87. Lonergan, P., Gutiérrez-Adán, A., Pintado, B., Fair, T., Ward, F., Fuente, J. D., & Boland, M. (2000). Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Molecular reproduction and development*, 57(2), 146–152. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200010\)57:2<146::AID-MRD5>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200010)57:2<146::AID-MRD5>3.0.CO;2-2)
88. 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>

89. Lonergan P. (2007). State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 64, 315–325. <https://doi.org/10.5661/rdr-vi-315>
90. Lopes, R. F., Forell, F., Oliveira, A. T., & Rodrigues, J. L. (2001). Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology*, 56(9), 1383–1392. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00641-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00641-0)
91. Machado, G. M., Ferreira, A. R., Pivato, I., Fidelis, A., Spricigo, J. F., Paulini, F., Lucci, C. M., Franco, M. M., & Dode, M. A. (2013). Post-hatching development of in vitro bovine embryos from day 7 to 14 *in vivo* versus *in vitro*. *Molecular reproduction and development*, 80(11), 936–947. <https://doi.org/10.1002/mrd.22230>
92. Maddox-Hyttel, P., Alexopoulos, N. I., Vajta, G., Lewis, I., Rogers, P., Cann, L., Callesen, H., Tveden-Nyborg, P., & Trounson, A. (2003). Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. *Reproduction (Cambridge, England)*, 125(4), 607–623.
93. 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>
94. Maître J. L. (2017). Mechanics of blastocyst morphogenesis. *Biology of the cell*, 109(9), 323–338. <https://doi.org/10.1111/boc.201700029>
95. Mandawala, A. A., Harvey, S. C., Roy, T. K., & Fowler, K. E. (2016). Time-lapse embryo imaging and morphokinetic profiling: Towards a general characterisation of embryogenesis. *Animal reproduction science*, 174, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.09.015>
96. Martins, D. (2009). Vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro* após lipólise química. Universidad de Estadual Paulista Faculda de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
97. Marzano, G., Mastrorocco, A., Zianni, R., Mangiacotti, M., Chiaravalle, A. E., Lacalandra, G. M., Minervini, F., Cardinali, A., Macciocca, M., Vicenti, R., Fabbri, R., Hinrichs, K., Dell'Aquila, M. E., & Martino, N. A. (2019). Altered morphokinetics in equine embryos from oocytes exposed to DEHP during IVM. *Molecular reproduction and development*, 86(10), 1388–1404. <https://doi.org/10.1002/mrd.23156>
98. Massip, A., Mulnard, J., Vanderzwalmen, P., Hanzen, C., & Ectors, F. (1982). The behaviour of cow blastocyst in vitro: cinematographic and morphometric analysis. *Journal of anatomy*, 134(Pt 2), 399–405.

99. Massip, A., Mermillod, P., & Dinnyes, A. (1995). Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Human reproduction (Oxford, England)*, *10*(11), 3004–3011. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a135837>
100. Mateusen, B., Van Soom, A., Maes, D. G., Donnay, I., Duchateau, L., & Lequarre, A. S. (2005). Porcine embryo development and fragmentation and their relation to apoptotic markers: a cinematographic and confocal laser scanning microscopic study. *Reproduction (Cambridge, England)*, *129*(4), 443–452. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00533>
101. 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>
102. Mellisho, E. A., Briones, M. A., Velásquez, A. E., Cabezas, J., Castro, F. O., & Rodríguez-Álvarez, L. (2019). Extracellular vesicles secreted during blastulation show viability of bovine embryos. *Reproduction (Cambridge, England)*, *158*(6), 477–492. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0233>
103. Memili, E., & First, N. L. (2000). Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote (Cambridge, England)*, *8*(1), 87–96. <https://doi.org/10.1017/s0967199400000861>
104. Merton, J. S., de Roos, A. P., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P. L., & 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)
105. Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsøe, K. M., Ramsing, N. B., & Remohí, J. (2011). The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human reproduction (Oxford, England)*, *26*(10), 2658–2671. <https://doi.org/10.1093/humrep/der256>
106. Moore, S. G., & Hasler, J. F. (2017). A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of dairy science*, *100*(12), 10314–10331. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13138>

107. Morotti, F., Sanches, B. V., Pontes, J. H., Basso, A. C., Siqueira, E. R., Lisboa, L. A., & Seneda, M. M. (2014). 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*, *81*(5), 696–701. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.12.002>
108. Motato, Y., de los Santos, M. J., Escriba, M. J., Ruiz, B. A., Remohí, J., & Meseguer, M. (2016). Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system. *Fertility and sterility*, *105*(2), 376–84.e9. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.001>
109. Moustafa, S. M., Rosen, E. M., Boylan, C., & Mersereau, J. E. (2020). Time to blastulation is superior to individual components of embryo grading for live-birth prediction. *F&S reports*, *1*(3), 243–248. <https://doi.org/10.1016/j.xfre.2020.09.016>
110. Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G. G., Hozbor, F., Cabodevila, J., & Alberio, R. H. (2006). Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, *65*(8), 1551–1562. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.020>
111. Mumusoglu, S., Ozbek, I. Y., Sokmensuer, L. K., Polat, M., Bozdog, G., Papanikolaou, E., & Yarali, H. (2017). Duration of blastulation may be associated with ongoing pregnancy rate in single euploid blastocyst transfer cycles. *Reproductive biomedicine online*, *35*(6), 633–639. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.08.025>
112. Muñoz, M., Uyar, A., Correia, E., Ponsart, C., Guyader-Joly, C., Martínez-Bello, D., Marquant-Le Guienne, B., Fernandez-Gonzalez, A., Díez, C., Caamaño, J. N., Trigal, B., Humblot, P., Carrocera, S., Martin, D., Seli, E., & Gomez, E. (2014). Metabolomic prediction of pregnancy viability in superovulated cattle embryos and recipients with fourier transform infrared spectroscopy. *BioMed research international*, *2014*, 608579. <https://doi.org/10.1155/2014/608579>
113. Muthukumar, K., Kamath, M. S., Mangalaraj, A. M., Aleyamma, T., Chandy, A., & George, K. (2013). Comparison of clinical outcomes following vitrified warmed day 5/6 blastocyst transfers using solid surface methodology with fresh blastocyst transfers. *Journal of human reproductive sciences*, *6*(1), 59–64. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.112384>
114. Nagy, Z. P., Dozortsev, D., Diamond, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Abdelmassih, R., & Greco, E. (2003). Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of

- embryo morphology significantly increases implantation rates. *Fertility and sterility*, 80(1), 67–74. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(03\)00569-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(03)00569-7)
115. 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>
 116. 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. *The Journal of reproduction and development*, 56(6), 649–654. <https://doi.org/10.1262/jrd.10-069h>
 117. Nothias, J. Y., Majumder, S., Kaneko, K. J., & DePamphilis, M. L. (1995). Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *The Journal of biological chemistry*, 270(38), 22077–22080. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.38.22077>
 118. 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, 33. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-12-33>
 119. Page, A. W., & Orr-Weaver, T. L. (1997). Stopping and starting the meiotic cell cycle. *Current opinion in genetics & development*, 7(1), 23–31. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(97\)80105-0](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(97)80105-0)
 120. Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., & First, N. L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25(4), 591–600. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(86\)90143-3](https://doi.org/10.1016/0093-691x(86)90143-3)
 121. Pieterse, M. C., Kappen, K. A., Kruip, T. A., & Taverne, M. A. (1988). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30(4), 751–762. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(88\)90310-x](https://doi.org/10.1016/0093-691x(88)90310-x)
 122. Ponsuksili, S., Wimmers, K., Adjaye, J., & Schellander, K. (2002). A source for expression profiling in single preimplantation bovine embryos. *Theriogenology*, 57(6), 1611–1624. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00661-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00661-1)
 123. Presicce, G. A., Xu, J., Gong, G., Moreno, J. F., Chaubal, S., Xue, F., Bella, A., Senatore, E. M., Yang, X., Tian, X. C., & Du, F. (2010). Oocyte source and hormonal stimulation for in vitro fertilization using sexed spermatozoa in cattle. *Veterinary medicine international*, 2011, 145626. <https://doi.org/10.4061/2011/145626>

124. Pribenszky, C., Losonczi, E., Molnár, M., Lang, Z., Mátyás, S., Rajczy, K., Molnár, K., Kovács, P., Nagy, P., Conceicao, J., & Vajta, G. (2010a). Prediction of in-vitro developmental competence of early cleavage-stage mouse embryos with compact time-lapse equipment. *Reproductive biomedicine online*, 20(3), 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.12.007>
125. Pribenszky, C., Mátyás, S., Kovács, P., Losonczi, E., Zádori, J., & Vajta, G. (2010b). Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reproductive biomedicine online*, 21(4), 533–536. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.04.015>
126. Ram, P. T., & Schultz, R. M. (1993). Reporter gene expression in G2 of the 1-cell mouse embryo. *Developmental biology*, 156(2), 552–556. <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1101>
127. Ramos-Ibeas, P., Lamas-Toranzo, I., Martínez-Moro, Á., de Frutos, C., Quiroga, A. C., Zurita, E., & Bermejo-Álvarez, P. (2020). Embryonic disc formation following post-hatching bovine embryo development in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)*, 160(4), 579–589. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0243>
128. Rehman, K. S., Bukulmez, O., Langley, M., Carr, B. R., Nackley, A. C., Doody, K. M., & Doody, K. J. (2007). Late stages of embryo progression are a much better predictor of clinical pregnancy than early cleavage in intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization cycles with blastocyst-stage transfer. *Fertility and sterility*, 87(5), 1041–1052. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.11.014>
129. Reichenbach, H. D., Liebrich, J., Berg, U., & Brem, G. (1992). Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced in vitro. *Journal of reproduction and fertility*, 95(2), 363–370. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0950363>
130. Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Pérez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of reproduction*, 68(1), 236–243. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007799>
131. 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>

132. Rodríguez-Alonso, B., Sánchez, J. M., González, E., Lonergan, P., & Rizos, D. (2020). Challenges in studying preimplantation embryo-maternal interaction in cattle. *Theriogenology*, *150*, 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.019>
133. Rodríguez-Alvarez, L., Sharbati, J., Sharbati, S., Cox, J. F., Einspanier, R., & Castro, F. O. (2010). Differential gene expression in bovine elongated (Day 17) embryos produced by somatic cell nucleus transfer and in vitro fertilization. *Theriogenology*, *74*(1), 45–59. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.12.018>
134. Rossant, J., & Tam, P. P. (2009). Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development (Cambridge, England)*, *136*(5), 701–713. <https://doi.org/10.1242/dev.017178>
135. Rowe, R., Del Campo, M., Eilts, C., French, L., Winch, R., Ginther, O. (1976). A single cannula technique for nonsurgical collection of ova from cattle. *Theriogenology*, *6*(5), 471–483. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(76\)90114-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(76)90114-X).
136. Salgado, R. M., Brom-de-Luna, J. G., Resende, H. L., Canesin, H. S., & Hinrichs, K. (2018). Lower blastocyst quality after conventional vs. Piezo ICSI in the horse reflects delayed sperm component remodeling and oocyte activation. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *35*(5), 825–840. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1174-9>
137. Sanches, B. V., Marinho, L. S., Filho, B. D., Pontes, J. H., Basso, A. C., Meirinhos, M. L., Silva-Santos, K. C., Ferreira, C. R., & Seneda, M. M. (2013). Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology*, *80*(4), 372–377. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.026>
138. 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>
139. Sawada, H., Yamazaki, K., & Hoshi, M. (1990). Trypsin-like hatching protease from mouse embryos: evidence for the presence in culture medium and its enzymatic properties. *The Journal of experimental zoology*, *254*(1), 83–87. <https://doi.org/10.1002/jez.1402540112>
140. Schneider, H. J., Jr, Castleberry, R. S., & Griffin, J. L. (1980). Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology*, *13*(1), 73–85. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(80\)90016-3](https://doi.org/10.1016/0093-691x(80)90016-3)

141. Seli, E., Bruce, C., Botros, L., Henson, M., Roos, P., Judge, K., Hardarson, T., Ahlström, A., Harrison, P., Henman, M., Go, K., Acevedo, N., Siques, J., Tucker, M., & Sakkas, D. (2011). Receiver operating characteristic (ROC) analysis of day 5 morphology grading and metabolomic Viability Score on predicting implantation outcome. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(2), 137–144. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9501-9>
142. Sermon K. (2002). Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. *Human reproduction update*, 8(1), 11–20. <https://doi.org/10.1093/humupd/8.1.11>
143. Seshagiri, P. B., Sen Roy, S., Sireesha, G., & Rao, R. P. (2009). Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching. *Journal of reproductive immunology*, 83(1-2), 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.06.264>
144. Shapiro, B., Daneshmand, S., Garner, F., 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. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.06.062
145. Shea B. F. (1981). Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology*, 15(1), 31–42. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(81\)80016-7](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(81)80016-7)
146. 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>
147. Sirard M. A. (2010). Activation of the embryonic genome. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 67, 145–158.
148. Sirard M. A. (2018). 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction (Cambridge, England)*, 156(1), R1–R7. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0008>
149. 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>
150. Soukhov, E., Karavani, G., Szaingurten-Solodkin, I., Alfayumi-Zeadna, S., Elharar, G., Richter, D., Wainstock, T., Zeadna, A., Levitas, E., & Har-Vardi, I. (2022). Prediction of embryo implantation rate using a sole parameter of timing of starting

- blastulation. *Zygote (Cambridge, England)*, 1–8. Advance online publication. <https://doi.org/10.1017/S0967199421000952>
151. Skarzynski, D. J., Piotrowska, K. K., Bah, M. M., Korzekwa, A., Woclawek-Potocka, I., Sawai, K., & Okuda, K. (2009). Effects of exogenous tumour necrosis factor-alpha on the secretory function of the bovine reproductive tract depend on tumour necrosis factor-alpha concentrations. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 44(3), 371–379. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01016.x>
 152. Stringfellow, D. A., Givens, M. D., & International Embryo Transfer Society. (2010). *Manual of the International Embryo Transfer Society: A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures*. Savory, Ill: International Embryo Transfer Society.
 153. Sugimura, S., Akai, T., Somfai, T., Hirayama, M., Aikawa, Y., Ohtake, M., Hattori, H., Kobayashi, S., Hashiyada, Y., Konishi, K., & Imai, K. (2010). Time-lapse cinematography-compatible polystyrene-based microwell culture system: a novel tool for tracking the development of individual bovine embryos. *Biology of reproduction*, 83(6), 970–978. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.085522>
 154. Sugimura, S., Akai, T., Hashiyada, Y., Somfai, T., Inaba, Y., Hirayama, M., Yamanouchi, T., Matsuda, H., Kobayashi, S., Aikawa, Y., Ohtake, M., Kobayashi, E., Konishi, K., & Imai, K. (2012). Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. *PloS one*, 7(5), e36627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036627>
 155. Sugimura, S., Akai, T., Hashiyada, Y., Aikawa, Y., Ohtake, M., Matsuda, H., Kobayashi, S., Kobayashi, E., Konishi, K., & Imai, K. (2013). Effect of embryo density on in vitro development and gene expression in bovine in vitro-fertilized embryos cultured in a microwell system. *The Journal of reproduction and development*, 59(2), 115–122. <https://doi.org/10.1262/jrd.2012-113>
 156. 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. doi:10.1262/jrd.2017-041
 157. Swain J. E. (2013). Could time-lapse embryo imaging reduce the need for biopsy and PGS?. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(8), 1081–1090. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0048-4>

158. Tadros, W., & Lipshitz, H. D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development (Cambridge, England)*, *136*(18), 3033–3042. <https://doi.org/10.1242/dev.033183>
159. Takeshita, N., & Kubo, H. (2004). Regulating preimplantation genetic diagnosis--how to control PGD. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *21*(1), 19–25. <https://doi.org/10.1023/b:jarg.0000017230.12954.90>
160. Thornhill, A. R., & Snow, K. (2002). Molecular diagnostics in preimplantation genetic diagnosis. *The Journal of molecular diagnostics: JMD*, *4*(1), 11–29. [https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60676-9](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60676-9)
161. Tithof, P. K., Roberts, M. P., Guan, W., Elgayyar, M., & Godkin, J. D. (2007). Distinct phospholipase A2 enzymes regulate prostaglandin E2 and F2alpha production by bovine endometrial epithelial cells. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, *5*, 16. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-5-16>
162. Turenne, N., Tiys, E., Ivanisenko, V., Yudin, N., Ignatieva, E., Valour, D., Degrelle, S. A., & Hue, I. (2012). Finding biomarkers in non-model species: literature mining of transcription factors involved in bovine embryo development. *BioData mining*, *5*(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1756-0381-5-12>
163. Vajta G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal reproduction science*, *60-61*, 357–364. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00097-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00097-x)
164. Vandaele, L., Mateusen, B., Maes, D. G., de Kruif, A., & Van Soom, A. (2007). Temporal detection of caspase-3 and -7 in bovine in vitro produced embryos of different developmental capacity. *Reproduction (Cambridge, England)*, *133*(4), 709–718. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0109>
165. Van Montfoort, A. P., Dumoulin, J. C., Kester, A. D., & Evers, J. L. (2004). Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Human reproduction (Oxford, England)*, *19*(9), 2103–2108. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh385>
166. Van Soom, A., Van Vlaenderen, I., Mahmoudzadeh, A. R., Deluyker, H., & de Kruif, A. (1992). Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology*, *38*(5), 905–919. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(92\)90165-n](https://doi.org/10.1016/0093-691x(92)90165-n)
167. Van Soom, A., Mijten, P., Van Vlaenderen, I., Van den Branden, J., Mahmoudzadeh, A. R., & de Kruif, A. (1994). Birth of double-musled Belgian Blue calves after transfer

- of in vitro produced embryos into dairy cattle. *Theriogenology*, 41(4), 855–867.
[https://doi.org/10.1016/0093-691x\(94\)90501-9](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)90501-9)
168. Van Soom, A., Boerjan, M. L., Bols, P. E., Vanroose, G., Lein, A., Coryn, M., & de Kruif, A. (1997). Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced *in vivo* after superovulation. *Biology of reproduction*, 57(5), 1041–1049.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod57.5.1041>
169. Vejlsted, M., Du, Y., Vajta, G., & Maddox-Hyttel, P. (2006). Post-hatching development of the porcine and bovine embryo--defining criteria for expected development *in vivo* and. *Theriogenology*, 65(1), 153–165.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.021>
170. Walker, A. M., Kimura, K., & Roberts, R. M. (2009). Expression of bovine interferon-tau variants according to sex and age of conceptuses. *Theriogenology*, 72(1), 44–53.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.017>
171. Ward, F., Enright, B., Rizos, D., Boland, M., & Lonergan, P. (2002). Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*, 57(8), 2105–2117.
[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00696-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00696-9)
172. Watson, A. J., Hogan, A., Hahnel, A., Wiemer, K. E., & Schultz, G. A. (1992). Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Molecular reproduction and development*, 31(2), 87–95.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1080310202>
173. Watson, A. J., & Barcroft, L. C. (2001). Regulation of blastocyst formation. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 6, D708–D730.
<https://doi.org/10.2741/watson>
174. Watson A. J. (2007). Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of animal science*, 85(13 Suppl), E1–E3.
<https://doi.org/10.2527/jas.2006-432>
175. Weems, C. W., Weems, Y. S., & Randel, R. D. (2006). Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 171(2), 206–228.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.11.014>
176. White, C. R., MacDonald, W. A., & Mann, M. R. (2016). Conservation of DNA Methylation Programming Between Mouse and Human Gametes and Preimplantation Embryos. *Biology of reproduction*, 95(3), 61.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.140319>

177. Willett, E. L., Black, W. G., Casida, L. E., Stone, W. H., & Buckner, P. J. (1951). Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science (New York, N.Y.)*, *113*(2931), 247. <https://doi.org/10.1126/science.113.2931.247>
178. Wilmut, I., & Rowson, L. E. (1973a). Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *The Veterinary record*, *92*(26), 686–690. <https://doi.org/10.1136/vr.92.26.686>
179. Wilmut, I., & Rowson, L. E. (1973b). The successful low-temperature preservation of mouse and cow embryos. *Journal of reproduction and fertility*, *33*(2), 352–353. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0330352>
180. Wilson, M., Hartke, K., Kiehl, M., Rodgers, J., Brabec, C., & Lyles, R. (2004). Transfer of blastocysts and morulae on day 5. *Fertility and sterility*, *82*(2), 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.03.023>
181. Wong, C. C., Loewke, K. E., Bossert, N. L., Behr, B., De Jonge, C. J., Baer, T. M., & Reijo Pera, R. A. (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nature biotechnology*, *28*(10), 1115–1121. <https://doi.org/10.1038/nbt.1686>
182. Wu, L., Han, W., Wang, J., Zhang, X., Liu, W., Xiong, S., Han, S., Liu, J., Gao, Y., & Huang, G. (2018). Embryo culture using a time-lapse monitoring system improves live birth rates compared with a conventional culture system: a prospective cohort study. *Human fertility (Cambridge, England)*, *21*(4), 255–262. <https://doi.org/10.1080/14647273.2017.1335886>
183. Yamagata, K., Yamazaki, T., Yamashita, M., Hara, Y., Ogonuki, N., & Ogura, A. (2005). Noninvasive visualization of molecular events in the mammalian zygote. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, *43*(2), 71–79. <https://doi.org/10.1002/gene.20158>
184. 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>
185. Zollner, U., Zollner, K. P., Hartl, G., Dietl, J., & Steck, T. (2002). The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Human reproduction (Oxford, England)*, *17*(5), 1327–1333. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.5.1327>

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Análisis de varianza de tasa de clivaje y blastocisto del grupo control con micropocillos.

Tabla ANOVA para % Clivaje por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	16.4168	1	16.4168	0.43	0.5175
Intra grupos	913.211	24	38.0504		
Total (Corr.)	929.627	25			

Tabla ANOVA para % Blastocisto por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	953.844	1	953.844	20.50	0.0001
Intra grupos	1116.77	24	46.5321		
Total (Corr.)	2070.61	25			

Anexo 2: Análisis de varianza de variables según viabilidad *in vitro*

Tabla ANOVA para Tiempo de blastulación (horas) por Viable-No Viable

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3302.05	1	3302.05	26.38	0.0000
Intra grupos	11764.9	94	125.158		
Total (Corr.)	15066.9	95			

Tabla ANOVA para Diámetro al momento de la blastulación (μm) por Viable-No Viable

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6.89553	1	6.89553	0.33	0.5646
Intra grupos	1939.53	94	20.6333		
Total (Corr.)	1946.43	95			

Tabla ANOVA para tiempo al estadio de blastocisto (Hr) por Viable-No Viable

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1450.07	1	1450.07	16.20	0.0001
Intra grupos	7786.56	87	89.5007		
Total (Corr.)	9236.63	88			

Tabla ANOVA para Diámetro al estadio de blastocisto (μm) por Viable-No Viable

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	63.9105	1	63.9105	1.10	0.2977
Intra grupos	5066.58	87	58.2365		
Total (Corr.)	5130.49	88			

Tabla ANOVA para Diámetro al día 7.5 (μm) por Viable-No Viable

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	24914.5	1	24914.5	98.48	0.0000
Intra grupos	23782.2	94	253.002		
Total (Corr.)	48696.7	95			

Anexo 3: Análisis de varianza de variables según blastulación temprana y tardía

Tabla ANOVA para Tiempo de blastulación (horas) por blastulación temprana - tardía

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9568.47	1	9568.47	163.58	0.0000
Intra grupos	5498.44	94	58.494		
Total (Corr.)	15066.9	95			

Tabla ANOVA para % de blastocistos al día 7.5, Diámetro (µm) por blastulación temprana - tardía

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	21488.6	1	21488.6	74.24	0.0000
Intra grupos	27208.1	94	289.448		
Total (Corr.)	48696.7	95			

Tabla ANOVA para viabilidad post eclosión al día 9.5, Diámetro (µm) por blastulación temprana - tardía

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4207.22	1	4207.22	0.52	0.4742
Intra grupos	437433.	54	8100.62		
Total (Corr.)	441641.	55			

Anexo 4: Análisis de varianza del tiempo de blastulación y viabilidad in vitro

Tabla ANOVA para Tiempo de blastulación (horas) por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9918.65	3	3306.22	59.08	0.0000
Intra grupos	5148.26	92	55.9593		
Total (Corr.)	15066.9	95			

Pruebas de Múltiple Rangos para Tiempo de blastulación (horas) por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamientos TABLA9	Casos	Media	Grupos Homogéneos
NV-BT	18	139.899	X
V-BT	31	140.081	X
V-BTA	7	153.464	X
NV-BTA	40	161.127	X

Contraste	Sig.	Diferencia
NV-BT - NV-BTA	*	-21.2276
NV-BT - V-BT		-0.181523
NV-BT - V-BTA	*	-13.5648
NV-BTA - V-BT	*	21.046
NV-BTA - V-BTA	*	7.66271
V-BT - V-BTA	*	-13.3833

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para diámetro al momento de la blastulación (µm) por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	224.65	3	74.8832	4.00	0.0100
Intra grupos	1721.78	92	18.715		
Total (Corr.)	1946.43	95			

Pruebas de Múltiple Rangos para diámetro al momento de la blastulación (µm) por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamientos TABLA9	Casos	Media	Grupos Homogéneos
NV-BTA	40	153.526	X
V-BT	31	155.164	XX
V-BTA	7	156.203	XX
NV-BT	18	157.655	X

Contraste	Sig.	Diferencia
NV-BT - NV-BTA	*	4.12849
NV-BT - V-BT		2.49064
NV-BT - V-BTA		1.45133
NV-BTA - V-BT		-1.63784
NV-BTA - V-BTA		-2.67716
V-BT - V-BTA		-1.03932

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para tiempo al estadio de blastocisto (horas) por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4691.57	3	1563.86	29.25	0.0000
Intra grupos	4545.06	85	53.4713		
Total (Corr.)	9236.63	88			

Pruebas de Múltiple Rangos para tiempo al estadio de blastocisto (horas) por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamientos TABLA9	Casos	Media	Grupos Homogéneos
V-BT	31	157.695	X
NV-BT	18	158.361	X
V-BTA	7	168.824	X
NV-BTA	33	173.112	X

Contraste	Sig.	Diferencia
NV-BT - NV-BTA	*	-14.7507
NV-BT - V-BT		0.66595
NV-BT - V-BTA	*	-10.4632
NV-BTA - V-BT	*	15.4167
NV-BTA - V-BTA		4.28753
V-BT - V-BTA	*	-11.1291

* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA para Diámetro al estadio de blastocisto (μm) por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	420.608	3	140.203	2.53	0.0626
Intra grupos	4709.88	85	55.4103		
Total (Corr.)	5130.49	88			

Pruebas de Múltiple Rangos para Diámetro al estadio de blastocisto (μm) por tratamiento

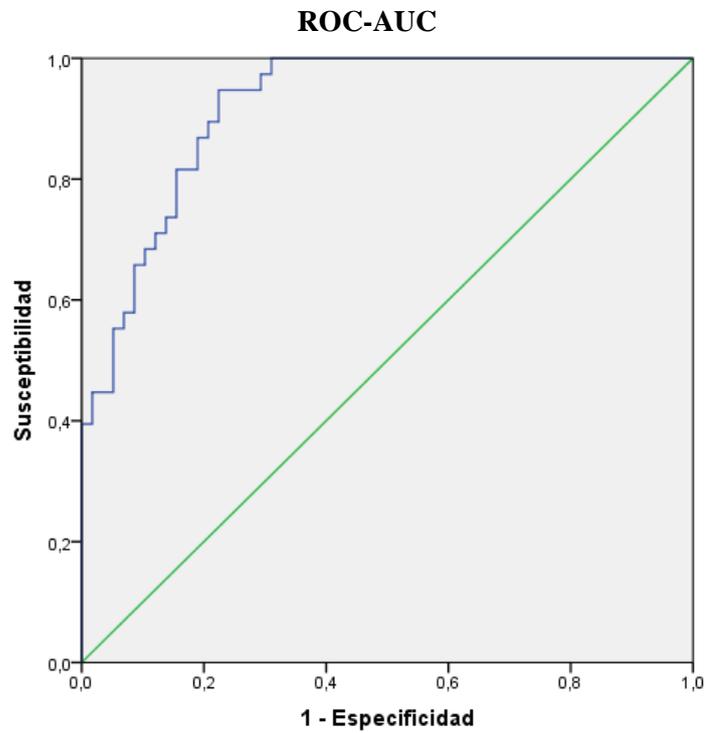
Método: 95.0 porcentaje Duncan

Tratamientos TABLA9	Casos	Media	Grupos Homogéneos
NV-BTA	33	165.278	X
V-BTA	7	168.055	X
V-BT	31	169.123	X
NV-BT	18	170.761	X

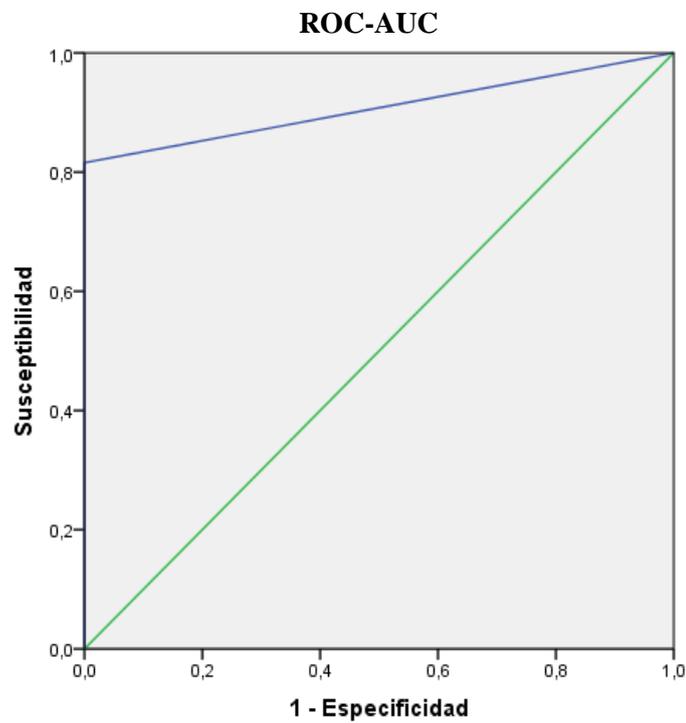
Contraste	Sig.	Diferencia
NV-BT - NV-BTA		5.48324
NV-BT - V-BT		1.63799
NV-BT - V-BTA		2.70634
NV-BTA - V-BT		-3.84525
NV-BTA - V-BTA		-2.7769
V-BT - V-BTA		1.06835

* indica una diferencia significativa.

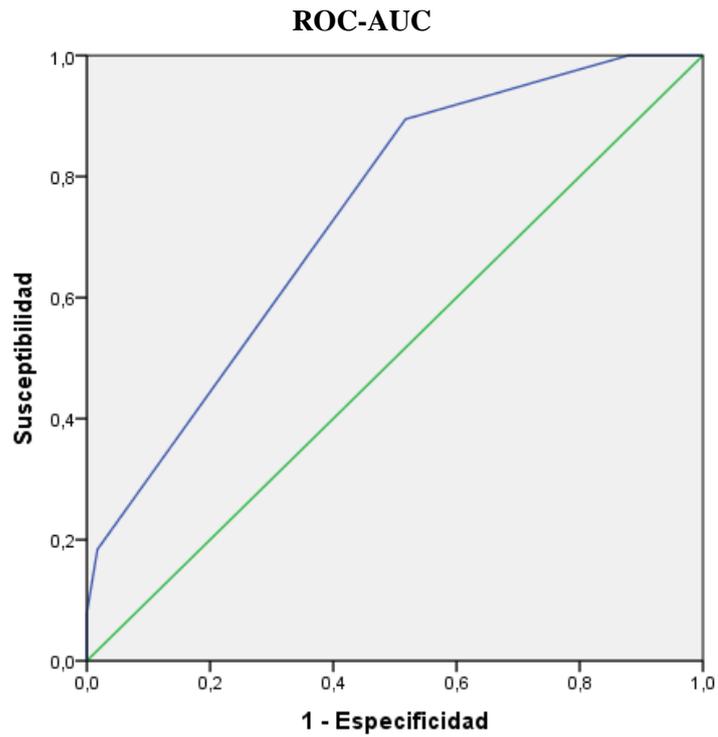
Anexo 5: Gráficos de la característica operativa del receptor con la determinación del área bajo la curva (ROC-AUC) de distintas variables sobre la viabilidad embrionaria



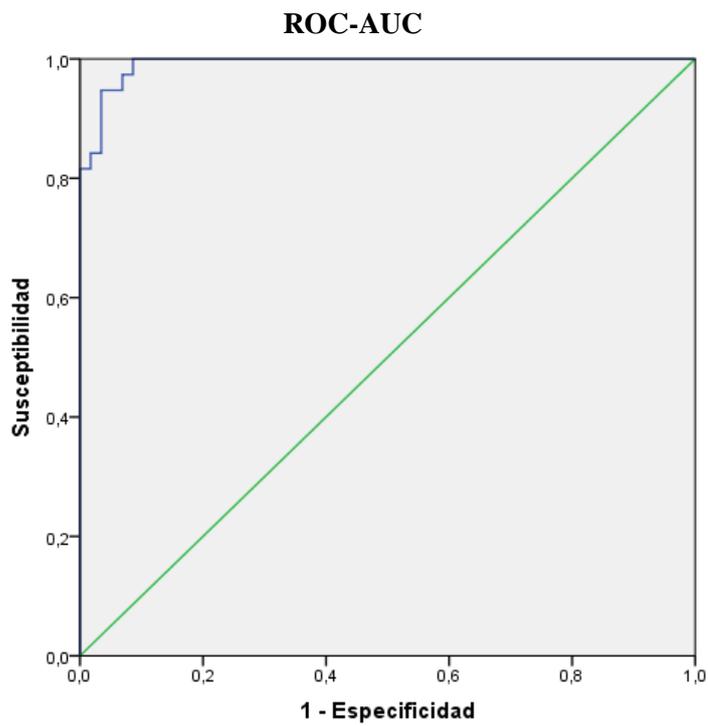
ROC-AUC del diámetro al día 7.5 (D7.5) sobre la viabilidad embrionaria



ROC-AUC de la categoría o clasificación de la blastulación (B) sobre la viabilidad embrionaria



ROC-AUC del estadio del embrión al día 7.5 (E7.5) sobre la viabilidad embrionaria



ROC-AUC del Modelo matemático-1