

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización *in vitro* en bovinos

Essential aspects on *in vitro* fertilization techniques in cattle

Erika Salgado-Cruz¹, Ricaurte Lopera-Vásquez^{2,3}

RESUMEN

La producción de embriones *in vitro* incluye un conjunto de técnicas utilizadas para la multiplicación en condiciones de laboratorio de líneas de animales genéticamente superiores. Para la obtención de embriones en el laboratorio se requieren diferentes protocolos y equipos que simulen las condiciones naturales de desarrollo de los embriones en la madre, buscando lograr resultados eficientes. La producción de embriones consta de tres etapas, maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos, fecundación *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV) de los posibles cigotos, buscando obtener blastocistos de calidad para una mayor eficiencia reproductiva y mejoramiento genético de los rebaños.

Palabras clave: maduración *in vitro*, fertilización *in vitro*, capacitación espermática, cultivo *in vitro*

ABSTRACT

In vitro embryo production includes several techniques for the multiplication of genetically superior animal lines under laboratory conditions. To obtain embryos in the laboratory, different protocols and equipment are required to simulate the natural conditions of development of the embryos in the mother, seeking to achieve efficient

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colombia, Villavicencio Meta, Colombia

² Grupo de investigación Impronta, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colombia Sede Ibagué, Tolima, Colombia

³ E-mail: ricaurte.lopera@campusucc.edu.co

Recibido: 5 de diciembre de 2019

Aceptado para publicación: 14 de julio de 2020

Publicado: 29 de septiembre de 2020

results. Embryo production consists of three stages, *in vitro* maturation (IVM) of oocytes, *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture (IVC) of possible zygotes, seeking to obtain a higher blastocysts quality for greater reproductive efficiency and genetic improvement of the herds.

Key words: *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, sperm capacitation, *in vitro* culture

INTRODUCCIÓN

La industria de la transferencia de embriones (TE) en bovinos fue establecida en Estados Unidos a inicios de los años 70 (Bó y Mapletoft, 2013). En la actualidad, el creciente campo de la TE permite considerarla como la contraparte femenina de la inseminación artificial. En los últimos 30 años, la TE ha sufrido avances importantes, en particular gracias a la producción *in vitro* de embriones, así como en las técnicas de manejo embrionario (Greve y Madison, 1991). La técnica de producción *in vitro* de embriones bovinos (PIVE), además de consolidarse como una de las técnicas de reproducción asistida más exitosa en los últimos décadas, ha permitido el desarrollo de variantes técnicas, abriendo la posibilidad de utilizarse con fines de investigación (desarrollo embrionario temprano, transgénesis y clonación) (Lonergan y Fair, 2014), en esquemas de mejoramiento genético (Wu y Zan, 2012), en el desarrollo de nuevas técnicas de reproducción asistida (Galli *et al.*, 2003) (Mapletoft, 2013) y con propósitos comerciales (Pontes *et al.*, 2011).

Exceptuando la recolección de los gametos, la PIVE puede dividirse en tres pasos esenciales: a) Maduración *in vitro* b) Fertilización *in vitro*, y c) Cultivo *in vitro* (Galli y Lazzari, 1996). El objetivo de este trabajo fue recopilar las técnicas más utilizadas en cada uno de estos procedimientos, además, de sugerir las técnicas de mejor perspectiva.

ASPECTOS ESENCIALES EN TÉCNICAS DE FERTILIZACIÓN IN VITRO

Existen diversas técnicas quirúrgicas y no quirúrgicas de extracción de gametos femeninos en bovinos, basadas en técnicas laparoscópicas o en técnicas guiadas por ultrasonografía como la aspiración folicular guiada por ultrasonografía (OPU-por sus siglas en inglés) (Galli *et al.*, 2001), así como de estructuras de animales procedentes de matadero. Sin embargo, todas estas técnicas se remiten a la extracción del contenido de los folículos y la obtención de gametos inmaduros (complejos *cumulus*-ovocito COC's) (Sutton *et al.*, 2003) que permiten, dado su estado fisiológico, obtener un mayor número y más homogeneidad en los procesos. En el laboratorio, todos los procesos comparten soporte y técnicas con el cultivo celular que permite el uso de materiales y fungibles para diversos usos.

La calidad de los ovocitos es esencial en la eficiencia de la maduración *in vitro* (MIV), y está relacionada desde su recolección por la cantidad y calidad de las células del *cumulus* adyacentes, así como por la calidad de su citoplasma (Boni *et al.*, 2002). Lo más valorado en las células del *cumulus* es su cantidad, considerando más de cuatro capas como el número adecuado, así como su posición, la cual se busca que estén rodeando completamente la zona pelúcida (Lourenço *et al.*, 2014). El citoplasma debe de presentar homogeneidad en su coloración marrón (café), por lo que cambios en esa coloración

a tonalidades más claras u oscuras, son criterios de descarte asociados a picnosis y degeneración, entre otros (Wood y Wildt, 1997). En base a estos conceptos morfológicos, entidades como la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS), han establecido criterios de selección de COC's clasificados en cuatro grados (de I a IV) (Calado *et al.*, 2001).

Maduración *in vitro* (MIV)

La MIV es el proceso contiguo a la extracción de los COC's y se considera el proceso mediante el cual los gametos femeninos adquieren la competencia para ser fecundados (Lonergan y Fair, 2008). Esto se debe a que los óvulos recolectados proceden de folículos de poco desarrollo, en fases iniciales de la onda folicular, con tamaños entre 2 y 8 mm (van Wagendonk-de Leeuw, 2006). Estos gametos, durante la MIV, logran finalizar su desarrollo y llegar al estadio de Metafase dos (MII) (Voronina y Wessel, 2003), donde adquieren su competencia citoplasmática y genética, pasando desde la acomodación de sus túbulos hasta la pérdida de un juego de cromosomas (haploides) (Smetanina *et al.*, 2014). Al ser un proceso secuencial, el éxito de los procesos siguientes (fecundación y desarrollo embrionario) depende en gran parte del desarrollo de los ovocitos madurados *in vitro* (Sutton *et al.*, 2003).

En condiciones óptimas, cerca del 95% de los ovocitos puede alcanzar la maduración y, de estos, cerca del 80% puede llegar al estadio de dos células; sin embargo, menos de la mitad (30-50%) alcanza al estado blastocisto siete días después de la fertilización (Ferré *et al.*, 2020). La eficacia de la MIV puede verse afectada por factores como: a) la recolección de los gametos, el método de recolección de los COC's, b) la temperatura del transporte, en donde temperaturas demasiado altas o muy bajas afectan la competencia ovocitaria, c) el tiempo de recolección y de transporte de los COC's desde la colecta al laboratorio, en donde tiempos muy

altos de procesamiento afectan la viabilidad de los COC's, d) su estadio de desarrollo, en donde óvulos ya maduros además de ser incompetentes para el proceso de MIV, afectan el rendimiento del lote, e) el tiempo de maduración (22-24 horas), f) la composición del medio de maduración y suplementos utilizados, y g) cambios en la osmolaridad, pH, y uso de hormonas (Smetanina *et al.*, 2014) o aminoácidos (Bahrami *et al.*, 2019).

En la técnica de MIV existen otros factores que también deben considerarse: a) el soporte físico (placa, tubo), b) modo de colocación del método de cultivo (gota o pozo), c) la adición de aceite mineral, d) el número de COC's por volumen de medio, y e) el movimiento (Hatýrnaz *et al.*, 2018) Entre los sistemas de cultivo para el desarrollo de la MIV se destacan: a) el cerrado, en donde no se permite el contacto directo con la atmósfera, mediante el uso de un recipiente hermético (mezcla de gases) (Ortí *et al.*, 2005) y b) el abierto, que se realiza manteniendo un intercambio gaseoso continuo (Smith y Rocha, 2012). El primero se considera de los más antiguos y al no permitir el intercambio gaseoso permanente, necesario para la maduración de los ovocitos, ha entrado en desuso, mientras que dentro del segundo grupo se encuentran el sistema abierto como tal y el recubierto (Gordon, 2003; Kocyigit, 2016).

En el sistema abierto se coloca el medio de cultivo en un recipiente que está en contacto directo con la atmósfera (placas petri, cámaras de cultivo, tubos etc.); sin embargo, la gran superficie de evaporación puede elevar el sodio y por consiguiente la osmolaridad (Gasperin *et al.*, 2010). Por otro lado, en el sistema recubierto se cubre el medio de cultivo con aceite mineral para evitar la evaporación del medio y permitir el intercambio gaseoso, aunque el aceite mineral puede favorecer la absorción de suplementos como hormonas (Gordon, 2003). El éxito de la fecundación, división y desarrollo embrionario presenta estricta relación de la competencia adquirida durante la MIV (Avery *et al.*, 2003).

Los medios de soporte más utilizados para la maduración *in vitro* son el KSOM (Yang *et al.*, 1994) y el TCM199 (Kim *et al.*, 1990), por su gran variedad de componentes iónicos y energéticos, que se correlacionan con el éxito presentado en cultivos de células en varias especies. La suplementación de estos medios de maduración pasa por diferentes sustancias en función del protocolo que se esté implementando. Los principales suplementos en orden de importancia son el suero fetal bovino (FCS), la albúmina sérica bovina (BSA), factores de crecimiento (IGF y EGF), y hormonas como FSH y LH (Sanbuissho y Threlfall, 1990). Tras el proceso de maduración, los aspectos de evaluación morfológica más evidentes son la expansión de las células del *cumulus* (Larsen *et al.*, 1991) y la expulsión del primer corpúsculo polar confirmando el estado de Metafase II (Ectors *et al.*, 1995).

Fertilización *In vitro* (FIV)

Una vez transcurrido la MIV, los COC's entran en contacto con los espermatozoides (fecundación propiamente dicha) para la FIV (Parrish, 2014). Este proceso engloba varios eventos, relacionados con la manipulación de los gametos masculinos y femeninos. Entre los eventos fisiológicos que ocurren en este periodo se encuentran la capacitación y penetración de los espermatozoides, la unión de los gametos y la formación de los pronúcleos. Un paso esencial es la selección de los espermatozoides más motiles y de mejor condición, en donde además se retiran sustancias no deseadas en el sistema de cultivo como diluyentes y crioprotectores (Liu *et al.*, 2013).

Entre las técnicas de selección espermática más usadas se encuentran las de migración, como el *Swim-Up* (Liu *et al.*, 2013), y las de lavado selectivo de subpoblaciones a través de centrifugación de gradientes de densidad como el Percoll® y el Bovipure® (Samardzija *et al.*, 2006). Si bien estas presentan diferentes fundamentos, ambas buscan los mismos objetivos (espermatozoides

motiles) (Arias *et al.*, 2017). Existen otras técnicas reportadas menos usadas como la migración a través de columnas de ácido hialurónico (Witt *et al.*, 2016), de moco cervical (Galli *et al.*, 1991) y de sustancias adhesivas (fibra de vidrio) (Engel *et al.*, 2001).

El método de *Swim-Up* se basa en la capacidad migratoria de los espermatozoides por sus propios movimientos, y consiste en colocar en el fondo de un tubo cónico con medio de selección espermática (inclinación de 45°) el contenido de la pajilla descongelada, durante 1 h a 38-39 °C. Pasado ese tiempo se retira el sobrenadante para recuperar los espermatozoides que se hayan desplazado a la parte superior (Magdanz *et al.*, 2019).

Los Gradientes de Densidad buscan separar los espermatozoides motiles y viables por medio de la sedimentación-centrifugación. Las células son sedimentadas en un gradiente que se encuentra en equilibrio equivalente con su propia densidad, lo que permite que, mediante la centrifugación, los espermatozoides motiles y viables lleguen al fondo del tubo cónico formando un «pellet», actuando en forma de filtro para el plasma seminal, células redondas, detritos espermatozoides no motiles, diluyentes y crioprotectores (Oliveira *et al.*, 2012). Estos gradientes pueden ser continuos (Ficoll) (Palomo *et al.*, 1999) o discontinuos (Percoll®, Bovipure®, Puresperm®) (Samardzija *et al.*, 2006). Los dos últimos son a base de silicio coloidal y generalmente se utilizan concentraciones de 45 y 90% o 30, 45 y 90% (García-Herreros y Leal, 2014), diluidas en medios inertes o de capacitación, y el tiempo de centrifugación es variable según el protocolo (5-20 min) (Arias *et al.*, 2017). Los productos más usados para el lavado de espermatozoides por gradientes discontinuos son el Percoll®, PureSperm® y el Bovipure® (Malvezzi *et al.*, 2014; Arias *et al.*, 2017).

El proceso de capacitación espermática se desarrolla en condiciones fisiológicas (Hunter, 2012), proceso que en condiciones

in vitro se procura realizar durante la selección y fecundación propiamente dicha (Parrish, 2014). Este proceso favorece cambios estructurales en el espermatozoide, mediado por sustancias llamadas «capacitantes» que promueven cambios estructurales y bioquímicos que conducen la eliminación de componentes adheridos a la membrana del espermatozoide, cambio de la composición lipídica de la membrana espermática, aumento de la permeabilidad a los iones Ca^{2+} , cambio en el pH interno y un incremento en la permeabilidad y metabolismo celular (Stival *et al.*, 2016) para lograr una correcta penetración y fusión al ovocito.

Entre los principales inductores de la capacitación espermática en condiciones *in vitro* se encuentran:

- Células del *cumulus* (mediante liberación de hormonas esteroideas se induce el flujo de calcio, se provoca activación, reacción acrosómica y quimiotaxis hacia el ovocito) (Van Soom *et al.*, 2002),
 - El Medio Tyrode's libre de calcio (iones, osmolaridad y pH permiten las modificaciones de membrana para la entrada de calcio) (Coy *et al.*, 2002).
 - La albumina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos (a través de la eliminación del colesterol y zinc, reducción de esteroides en las células y del nivel de los fosfolípidos de la membrana) (Stewart-Savage, 1993; Xia y Ren, 2009).
 - La heparina y otros glucosaminoglicanos (GAG), donde la heparina es considerada el GAG más potente para inducir la capacitación espermática en bovinos (Parrish, 2014) (se une a la membrana mediante proteínas del plasma seminal, reduciendo la actividad del calcio-ATPasa, permitiendo la entrada de calcio extracelular) (Leemans *et al.*, 2019).
 - Los aminoácidos y catecolaminas (hipotaurina, penicilamina y epinefrina [PHE]) (Gonçalve *et al.*, 2014), que permiten mantener una buena motilidad espermática e incrementar las tasas de penetración del ovocito.
- Los ionóforos de calcio que ayudan a abrir los canales de calcio, y activan la reacción acrosómica (Pereira *et al.*, 2000; Stival *et al.*, 2016).
 - La cafeína que favorece la hipermotilidad espermática, y presenta efecto sinérgico con la heparina (Barakat *et al.*, 2015).

Tras la selección espermática se determina la concentración, que permite conocer y ajustar la cantidad de espermatozoides que serán colocados con los ovocitos maduros. El conteo se realiza con hemocitómetro o cámara de Thoma (Anzar *et al.*, 2009), y el ajuste suele realizarse a dosis que varían entre 1 y 6×10^6 espermatozoides/ml de medio de fecundación, dependiendo del protocolo utilizado (Mohanty *et al.*, 2018). Tras la adición de los espermatozoides al medio de fertilización con los óvulos previamente ubicados, se consolida el cocultivo con los óvulos y espermatozoides en medio de fertilización, por periodos entre 18 y 22 horas en ambiente de alta humedad y protegidos de la luz (Parrish *et al.*, 1986).

Los sistemas para el desarrollo de la FIV suelen ser similares a la MIV, permitiendo ser abiertos o bajo aceite mineral, utilizándose con más frecuencia el recubierto y en gotas (Martinez *et al.*, 2017; Aravina *et al.*, 2019). Las gotas son más utilizadas cuando se usa semen sexado, al buscar optimizar el número de espermatozoides en función del número de ovocitos (Xu *et al.*, 2006; An *et al.*, 2017; Hasegawa *et al.*, 2014). Para el desarrollo de la FIV se utilizan medios como el TALP (Costa *et al.*, 2010), el TCM-199 o el SOF (Mastromonaco *et al.*, 2004), los cuales pueden ir suplementados por distintos componentes, como células oviductales (Yang *et al.*, 1994), células del *cumulus* (Chian *et al.*, 1995), BSA (libre de ácidos grasos), heparina, oPHE (Parrish, 2014; Kang *et al.*, 2015).

Cultivo de Embriones

Trascurrido el tiempo de la fertilización, los presuntos cigotos se retiran del medio de la fertilización *in vitro*. En primer lugar, se

retiran las células de *cumulus* adyacentes a los presuntos cigotos y luego se les clasifican. Finalmente, los cigotos desnudos y los de mejor calidad pasan al sistema de cultivo (Cebrian-Serrano *et al.*, 2013). La remoción de las células del *cumulus* se puede realizar a través de pipeteo fino, con el uso de hialuronidasa, o a través de vórtex (agitación) a los presuntos cigotos (Gordon, 2003). La clasificación de los presuntos cigotos se hace siguiendo el criterio de clasificación ovocitaria para citoplasma, buscando eliminar estructuras con citoplasmas claros u oscuros, en estado de apoptosis o degenerados (Van Soom *et al.*, 2003).

El cultivo embrionario se puede definir como el periodo en el cual se desarrollan las estructuras desde presuntos cigotos hasta blastocistos. Este periodo está comprendido entre el día 1 y el día 7 del desarrollo embrionario. Este cultivo se puede desarrollar bajo diferentes características, que pueden diferir en: a) soporte (placa de Petri, placa de cuatro pozos, en gotas), con o sin cobertura de aceite mineral (Smith y Rocha, 2012), b) medio (medio simple definido, semi-definido indefinido, medios condicionados) (Lopera-Vásquez *et al.*, 2016), c) tipos de células (cocultivo) (Cordova *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2017).

El medio de cultivo es un aspecto fundamental en el cultivo embrionario, ya que este debe proporcionar condiciones óptimas para el desarrollo del embrión. El medio de cultivo definido más utilizado en bovinos es el fluido oviductal sintético (SOF), que basa su composición en el fluido del oviducto bovino y es considerado es uno de los que mejor asemeja las condiciones de cultivo en condiciones fisiológicas (Holm *et al.*, 1999). Sin embargo, se han reportado cultivo de embriones utilizando TCM199 (Kim *et al.*, 1990), KSOM (Liu y Foote, 1995) y CR1aa (Rosenkrans *et al.*, 1993).

En general, los medios están compuestos por sales inorgánicas (NaCl, KCl), fuentes energéticas (glucosa, piruvato y lactato

de sodio), amortiguadores de pH (NaHCO_3) (Holm *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1990) y en algunas oportunidades de fuentes proteicas (suplementos) como la BSA (Palasz *et al.*, 2006) o FCS (Leivas *et al.*, 2011). Según la especificidad de los suplementos, se derivan los términos indefinidos, semidefinidos (Kim *et al.*, 1993) y definidos (van der Valk *et al.*, 2010), descritos previamente, en donde los cocultivos a través de las sustancias que secreta también pueden ser incluidos (Lopera-Vásquez *et al.*, 2016).

Los indefinidos usan sustancias altamente inespecíficas que contienen gran variedad de otras sustancias como el FCS, que favorecen el crecimiento embrionario (Rizos *et al.*, 2003). Dentro de estos se incluyen los cocultivos con células somáticas como células del *cumulus* (Thomas y Seidel, 1993), células de la granulosa (Goto *et al.*, 1994), células del oviducto (Lopera-Vásquez *et al.*, 2016), células de hígado de rata, y células Vero (Gómez *et al.*, 2008), para estimular el desarrollo y la calidad de los embriones mediante mecanismos como la disminución del estrés oxidativo, hipoxia en el transporte de fluidos a través de la membrana, la estabilidad del pH, la acción surfactante, y acciones como el reinicio de la meiosis (Cordova *et al.*, 2014). Además, se consideran herramientas potentes para el estudio de mecanismos fisiológicos en condiciones *in vitro* (Cordova *et al.*, 2013).

Suplementos como el FCS (Leivas *et al.*, 2011) y la BSA (Palasz *et al.*, 2006) presentan buenos resultados de desarrollo embrionario, inclusive donde su uso alternado o escalonado busca reducir el riesgo asociado a cada uno de ellos (sistemas de cultivo en «dos pasos») (Felmer *et al.*, 2011).

Los sistemas definidos hacen referencia al uso de sustancias altamente específicas como polímeros sintéticos como el alcoholpolivinílico (PVA) y la polivinilpirrolidona (PVP), o algún tipo de BSA, o factores de crecimiento IGF, EGF (Ahumada *et al.*, 2013) o hialuronato (Furnus *et al.*,

1998). Debido a falencias asociadas a inespecificidad de los sistemas indefinidos, las investigaciones a nivel mundial avanzan en busca de retirar el FCS (Murillo *et al.*, 2017), y si bien algunos autores reportan menor eficiencia de producción, otros han observado tasas similares de producción de embriones y diferencias metabólicas importantes entre embriones cultivados con o sin estos componentes (Rizos *et al.*, 2003).

La valoración del desarrollo y la calidad embrionaria son puntos álgidos para conocer la eficiencia y calidad de los sistemas de maduración, fecundación y cultivo. Este se puede realizar al día 2 o 3 de haber realizado la fertilización (estadios de 2-4 o más células) denominado tasa de división o *cleavage* (clivaje) (Van Soom *et al.*, 2003), al día 5 o 6 (mórulas o mórulas compactas) denominado previsión, y día 7 (blastocistos) o desarrollo embrionario (Maddox-Hyttell *et al.*, 2003) con el fin de producir y seleccionar los embriones con las mejores cualidades a transferir buscando obtener el mayor número de gestaciones.

La calidad del embrión es un aspecto importante que refleja la eficiencia y desarrollo de los procesos embrionarios. Si bien existen diversas formas de valorar la calidad del embrión, la más utilizada para este fin es la morfología (Van Soom *et al.*, 2003), en donde por su estadio de desarrollo y por las características de su apariencia, se clasifica según los criterios de la IETS (Rocha *et al.*, 2016). Entre los aspectos más relevantes se encuentra la simetría, la homogeneidad y la coloración de la estructura del embrión, al igual que la coincidencia con el tiempo de desarrollo (Mapletoft, 2013). En este aspecto, las fases más tempranas presentan menores tasas de preñez en comparación con fases de desarrollo más avanzadas; sin embargo, fases avanzadas como blastocistos eclosionando o eclosionados, pueden ser más sensibles a cualquier cambio de ambiente en el transporte o transferencia (Chimote *et al.*, 2013).

La calidad del embrión influye directamente sobre las tasas de preñez, donde se observa 10% más de preñeces con embriones en comparación con un nivel de calidad inmediatamente anterior (Pontes *et al.*, 2009). La eficiencia de los niveles de preñez después de la transferencia embrionaria puede verse afectada por factores extrínsecos e intrínsecos. Los extrínsecos están asociados a factores externos a la receptora como bienestar del animal, medio ambiente, manejo animal y alimentación. Los intrínsecos se relacionan con la fisiología de la madre y del embrión, en donde son relevantes el tamaño del cuerpo lúteo de la receptora, el desarrollo y calidad del embrión, la eficiencia del semen en la FIV y la dificultad de la transferencia (Roper *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

- La producción de embriones *in vitro* es un proceso multifactorial en donde además de existir diversas técnicas para cada paso, la elección de cada una de estas deberá ser cautelosa y basada en resultados previos y condiciones de trabajo, ya que de esta decisión y aplicación dependerá el éxito o el fracaso de la producción de embriones.
- Aspectos como la temperatura, atmósfera de gases, pH, medios, suplementos, tipo de soporte, sistema de cultivo y tiempos de incubación, al igual que la destreza y el tipo de técnica a utilizar en cada proceso afecta la eficiencia de la técnica, el desarrollo de los embriones y la posterior transferencia.
- Factores externos al laboratorio como el mismo proceso de recolección de ovocitos o transferencia embrionaria, son determinantes en la eficiencia de la técnica.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Cooperativa de Colombia, en particular a las sedes de Villavicencio e Ibagué, por el apoyo para la elaboración de este manuscrito.

LITERATURA CITADA

1. **Ahumada CJ, Salvador I, Cebrian-Serrano A, Lopera R, Silvestre MA. 2013.** Effect of supplementation of different growth factors in embryo culture medium with a small number of bovine embryos on *in vitro* embryo development and quality. *Animal* 7: 455-462. doi: 10.1017/S1751731112001991
2. **An L-Y, Chaubal SA, Liu Y, Chen Y, Nedambale TL, Xu J, Xue F, et al. 2017.** Significant heparin effect on bovine embryo development during sexed *in vitro* fertilization. *J Reprod Dev* 63: 175-183. doi: 10.1262/jrd.2016-142
3. **Anza M, Kroetsch T, Buhr MM. 2009.** Comparison of different methods for assessment of sperm concentration and membrane integrity with bull semen. *J Androl* 30: 661-668. doi: 10.2164/jandrol.108.007500
4. **Aravina M, Diers S, Knorr C, Tetens J, Blaschka C. 2019.** Effects of an oil covered culture system on bovine *in vitro* produced embryos. In: Proc 35th Annual Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE). Murcia, Spain.
5. **Arias ME, Andara K, Briones E, Felmer R. 2017.** Bovine sperm separation by swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): effect on sperm quality, function and gene expression. *Reprod Biol* 17: 126-132. doi: 10.1016/j.repbio.2017.03.002
6. **Avery B, Ströbech L, Jacobsen T, Bøgh IB, Greve T. 2003.** *In vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes in undiluted follicular fluid: effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. *Theriogenology* 59: 987-999. doi: 10.1016/s0093-691x(02)01139-1
7. **Bahrami M, Morris MB, Day ML. 2019.** Amino acid supplementation of a simple inorganic salt solution supports efficient *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes. *Sci Rep* 9: 11739. doi:10.1038/s41598-019-48038-y
8. **Barakat IA, Danfour MA, Galewan FA, Dkhil MA. 2015.** Effect of various concentrations of caffeine, pentoxifylline, and kallikrein on hyperactivation of frozen bovine semen. *Biomed Res Int* 2015: 948575. doi: 10.1155/2015/948575
9. **Bó G, Mapletoft R. 2013.** Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim Reprod* 10: 344-348.
10. **Boni R, Cuomo A, Tosti E. 2002.** Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biol Reprod* 66: 836-842. doi:10.1095/biolreprod66.3.836
11. **Calado AM, Rocha E, Colaço A, Sousa M. 2001.** Stereologic characterization of bovine (*Bos taurus*) cumulus-oocyte complexes aspirated from small antral follicles during the diestrous phase. *Biol Reprod* 65: 1383-1391. doi:10.1095/biolreprod65.5.1383
12. **Carvalho AV, Canon E, Jouneau L, Archilla C, Laffont L, Moroldo M, Ruffini S, et al. 2017.** Different co-culture systems have the same impact on bovine embryo transcriptome. *Reproduction* 154: 695-710. doi: 10.1530/REP-17-0449
13. **Cebrian-Serrano A, Salvador I, García-Roselló E, Pericuesta E, Pérez-Cerezales S, Gutiérrez-Adán A, Coy P, et al. 2013.** Effect of the bovine oviductal fluid on *in vitro* fertilization, development and gene expression of *in vitro*-produced bovine blastocysts. *Reprod Domest Anim* 8:331-8. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02157
14. **Chian RC, Okuda K, Niwa K. 1995.** Influence of cumulus cells on *in vitro* fertilization of bovine oocytes derived from *in vitro* maturation. *Anim Reprod Sci* 38: 37-48. doi: 10.1016/0378-4320(94)01357-R

15. **Chimote NM, Chimote NN, Nath NM, Mehta BN. 2013.** Transfer of spontaneously hatching or hatched blastocyst yields better pregnancy rates than expanded blastocyst transfer. *J Hum Reprod Sci* 6: 183-188. doi: 10.4103/0974-1208.121420
16. **Cordova A, Perreau C, Schmaltz-Panneau B, Locatelli Y, Ponsart C, Mermillod P. 2013.** Mise en évidence d'un dialogue moléculaire et fonctionnel entre l'embryon préimplantatoire bovin et l'oviducte grâce à un modèle *in vitro*. *Gynecol Obstet Fertil* 41: 537-539. doi: 10.1016/j.gyobfe.2013.07.015
17. **Cordova A, Perreau C, Uzbekova S, Ponsart C, Locatelli Y, Mermillod P. 2014.** Development rate and gene expression of IVP bovine embryos cocultured with bovine oviduct epithelial cells at early or late stage of preimplantation development. *Theriogenology* 81: 1163-1173. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.01.012
18. **Costa MZ, Oliveira LZ, Resende MV, Lucio AC, Perini AP, Miguel MCV, Lima VFMH. 2010.** Induction of the acrosome reaction test to *in vitro* estimate embryo production in Nelore cattle. *Arq Bras Med Vet Zoo* 62: 771-777. doi: 10.1590/S0102-09352010000-400001
19. **Coy P, Gadea J, Romar R, Matás C, García E. 2002.** Effect of *in vitro* fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and *in vitro* development in pigs. *Reproduction* 124: 279-288. doi: 10.1530/rep.0.1240279
20. **Ectors FJ, Koulischer L, Jamar M, Herens C, Verloes A, Remy B, Beckers JF. 1995.** Cytogenetic study of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 44: 445-50. doi: 10.1016/0093-691x(95)00198-h
21. **Engel S, Weber H, Petzoldt R, Seidl B, Wiehe W, Sperl J. 2001.** An improved method of sperm selection by glass wool filtration. *Andrologia* 33: 223-230. doi: 10.1046/j.1439-0272.2001.00434.x
22. **Felmer RN, Arias ME, Muñoz GA, Rio JH. 2011.** Effect of different sequential and two-step culture systems on the development, quality, and RNA expression profile of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 78: 403-414. doi: 10.1002/mrd.21317
23. **Ferré LB, Kjelland ME, Ströbech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ. 2020.** Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* 14: 991-1004. doi: 10.1017/S1751731119002775
24. **Furnus CC, de Matos DG, Martínez AG. 1998.** Effect of hyaluronic acid on development of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* 49: 1489-1499. doi: 10.1016/s0093-691x(98)00095-8
25. **Galli A, Basetti M, Balduzzi D, Martignoni M, Bornaghi V, Maffii M. 1991.** Frozen bovine semen quality and bovine cervical mucus penetration test. *Theriogenology* 35: 837-844. doi: 10.1016/0093-691X(91)90424-C
26. **Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. 2001.** Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55: 1341-1357. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00486-1
27. **Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, et al. 2003.** Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59: 599-616. doi: 10.1016/s0093-691x(02)01243-8
28. **Galli C, Lazzari, G. 1996.** Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Anim Reprod Sci* 42: 371-379. doi: 10.1016/0378-4320(96)01530-8
29. **García-Herreros M, Leal CL. 2014.** Comparative study of sperm washing and selection methods after cryopreservation and its influence on sperm subpopulational structure in a bovine model. *Syst Biol Reprod Med* 60: 338-347. doi: 10.3109/19396368.2014.938279

30. **Gasperin BG, Barreta MH, Santos JT, Ferreira R, Neves JP, Oliveira JFC, Gonçalves PBD. 2010.** Oil-free culture system for *in vitro* bovine embryo production. *Int J Anim Sci* 9: e32. doi: 10.4081/ijas.2010.e32
31. **Gómez E, Rodríguez A, Muñoz M, Caamaño JN, Hidalgo CO, Morán E, Facal N, Díez C. 2008.** Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology* 69: 1013-1021. doi: 10.1016/j.theriogenology.-2007.12.015
32. **Gonçalves FS, Barretto LS, Arruda RP, Perri SH, Mingoti GZ. 2014.** Heparin and penicillamine-hypotaurine-epinephrine (PHE) solution during bovine *in vitro* fertilization procedures impair the quality of spermatozoa but improve normal oocyte fecundation and early embryonic development. *In vitro Cell Dev Biol Anim* 50: 39-47. doi: 10.1007/s11626-013-9675-4
33. **Gordon I. 2003.** Laboratory production of cattle embryos, 2nd ed. CABI Publishing. 592 p.
34. **Goto K, Iwai N, Ide K, Takuma Y, Nakanishi Y. 1994.** Viability of one-cell bovine embryos cultured *in vitro*: comparison of cell-free culture with co-culture. *J Reprod Fertil* 100: 239-243. doi: 10.1530/jrf.0.1000239
35. **Greve T, Madison V. 1991.** *In vitro* fertilization in cattle: a review. *Reprod Nutr Dev* 31: 147-157.
36. **Hasegawa A, Mochida K, Tomishima T, Inoue K, Ogura A. 2014.** Microdroplet *in vitro* fertilization can reduce the number of spermatozoa necessary for fertilizing oocytes. *J Reprod Dev* 60: 187-193. doi: 10.1262/jrd.2013-136
37. **Hatýrnaz B, Ata B, Hatýrnaz ES, Dahan MH, Tannus S, Tan J, Tan SL. 2018.** Oocyte *in vitro* maturation: a systematic review. *Turk J Obstet Gynecol* 15: 112-125. doi: 10.4274/tjod.23911
38. **Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. 1999.** High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52: 683-700. doi: 10.1016/S0093-691X(99)00162-4
39. **Hunter RH. 2012.** Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 87: 244-255. doi: 10.1111/j.1469-185X.2011.00196.x
40. **Kang SS, Koyama K, Huang W, Yang Y, Yanagawa Y, Takahashi Y, Nagano M. 2015.** Addition of D-penicillamine, hypotaurine, and epinephrine (PHE) mixture to IVF medium maintains motility and longevity of bovine sperm and enhances stable production of blastocysts *in vitro*. *J Reprod Dev* 61: 99-105. doi: 10.1262/jrd.2014-112
41. **Kim CI, Ellington JE, Foote RH. 1990.** Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM199 and a simple defined medium with co-culture. *Theriogenology* 33: 433-440. doi:10.1016/0093-691x(90)-90501-j
42. **Kim JH, Funahashi H, Niwa K, Okuda K. 1993.** Glucose requirement at different developmental stages of *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology* 39: 875-886. doi: 10.1016/0093-691x(93)-90425-5
43. **Kocyigit A. 2016.** A review of *in vitro* culture systems in bovine reproductive biotechnologies. *J Vet Res Ani Husband* 1(1): 101.
44. **Larsen WJ, Wert SE, Chen L, Russell P, Hendrix EM. 1991.** Expansion of the cumulus-oocyte complex during the preovulatory period: possible roles in oocyte maturation, ovulation, and fertilization. In: Familiari G, Makabe S, Motta PM (eds). *Ultrastructure of the ovary*. Springer. p 45-61.
45. **Leemans B, Stout TAE, De Schauwer C, Heras S, Nelis H, Hoogewijs M, Van Soom A, et al. 2019.** Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species? *Reproduction* 157: R181-R197. doi: 10.1530/REP-18-0541

46. **Leivas FG, Brum DS, Fialho SS, Saliba WP, Alvim MT, Bernardi ML, Rubin MI, et al. 2011.** Fetal calf serum enhances *in vitro* production of *Bos taurus* indicus embryos. *Theriogenology* 75: 429-433. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.08.017
47. **Liu B, Cui Y, Yu S. 2013.** Effect of swim-up and percoll treatment on sperm quality and *in vitro* embryo development in yak. *J Integr Agr* 12: 2235-2242. doi: 10.1016/S2095-3119(13)60378-0
48. **Liu Z, Foote RH. 1995.** Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol Reprod* 53: 786-790. doi: 10.1095/biolreprod53.4.786
49. **Lonergan P, Fair T. 2008.** *In vitro*-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* 69: 17-22. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.09.007
50. **Lonergan P, Fair T. 2014.** The ART of studying early embryo development: progress and challenges in ruminant embryo culture. *Theriogenology* 81: 49-55. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.-09.021
51. **Lopera-Vásquez R, Hamdi M, Fernandez-Fuertes B, Maillo V, Beltrán-Breña P, Calle A, Redruello A, et al. 2016.** Extracellular vesicles from BOEC in *in vitro* embryo development and quality. *PLoS One* 11: e0148083. doi: 10.1371/journal.pone.-0148083
52. **Lourenço B, Sousa AP, Almeida-Santos T, Ramalho-Santos J. 2014.** Relation of cumulus cell status with single oocyte maturity, fertilization capability and patient age. *J Reprod Infertil* 15: 15-21.
53. **Maddox-Hyttell P, Gjørret JO, Vajta G, Alexopoulos NI, Lewis I, Trounson A, Viuff D, et al. 2003.** Morphological assessment of preimplantation embryo quality in cattle. *Reprod Suppl* 61: 103-116. doi: 10.1530/biosciproc.5.009
54. **Magdanz V, Boryshpolets S, Ridzewski C, Eckel B, Reinhardt K. 2019.** The motility-based swim-up technique-separates bull sperm based on differences in metabolic rates and tail length. *PLoS One* 14: e0223576. doi: 10.1371/journal.pone.0223576
55. **Malvezzi H, Sharma R, Agarwal A, Abuzenadah AM, Abu-Elmagd M. 2014.** Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial. *Reprod Biol Endocrinol* 12:121. doi:10.1186/1477-7827-12-121
56. **Mapletoft R. 2013.** History and perspectives on bovine embryo transfer. *Anim Reprod* 6: 168-173.
57. **Martinez CA, Nohalez A, Parrilla I, Motas M, Roca J, Romero I, García-González DL, et al. 2017.** The overlaying oil type influences embryo production: Differences in composition and compound transfer into incubation medium between oils. *Scientific Reports* 7: 10505. doi: 10.1038/s41598-017-10989-5
58. **Mastromonaco GF, Semple E, Robert C, Rho GJ, Betts DH, King WA. 2014.** Different culture media requirements of IVF and nuclear transfer bovine embryos. *Reprod Domest Anim* 39: 462-467. doi:10.1111/j.1439-0531.2004.-00548.x
59. **Mohanty TK, Lone SA, Kumaresan A, Bhakat M, Kumar R, Baithalu RK, Mohanty AK. 2018.** Sperm dosage and site of insemination in relation to fertility in bovines. *Asian Pacific J Reprod* 7: 1-5. doi: 10.4103/2305-0500.220977
60. **Murillo A, Muñoz M, Martín-González D, Carrocera S, Martínez-Nistal A, Gómez E. 2017.** Low serum concentration in bovine embryo culture enhances early blastocyst rates on Day-6 with quality traits in the expanded blastocyst stage similar to BSA-cultured embryos. *Reprod Biol* 17: 162-171. doi: 10.1016/j.repbio.2017.04.002

61. **Oliveira LZ, Arruda RP, Celeghini EC, de Andrade AF, Perini AP, Resende MV, Miguel MC, et al. 2012.** Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association. *Andrologia* 44: 9-15. doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01096.x
62. **Ortí NG, Huerta LG, Hoya MG de la, Espinosa E, Serrano AJ. 2005.** Sistema de incubación en bolsas gaseadas: alternativa al cultivo *in vitro* de embriones bovino. *Agrofaz* 5:, 689-696.
63. **Palasz AT, Rodriguez-Martinez H, Beltran-Breña P, Perez-Garnelo S, Martinez MF, Gutierrez-Adan A, De la Fuente J. 2006.** Effects of hyaluronan, BSA, and serum on bovine embryo *in vitro* development, ultrastructure, and gene expression patterns. *Mol Reprod Dev* 73: 1503-1511. doi: 10.1002/mrd.20516
64. **Palomo MJ, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT. 1999.** Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 51: 927-940. doi: 10.1016/s0093-691x(99)00039-4
65. **Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. 1986.** Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25: 591-600. doi: 10.1016/0093-691x(86)90143-3
66. **Parrish JJ. 2014.** Bovine *in vitro* fertilization: *in vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology* 81: 67-73. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.08.005
67. **Pereira RJ, Tuli RK, Wallenhorst S, Holtz W. 2000.** The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore a 23187 on *in vitro* induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. *Theriogenology* 54: 185-192. doi: 10.1016/S0093-691x(00)-00340-x
68. **Pontes JH, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KC, Seneda MM. 2011.** Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 75: 1640-1646. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.12.026
69. **Pontes JH, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TR, Oliveira JA, et al. 2009.** Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 71: 690-697. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.031
70. **Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P. 2003.** Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod* 68: 236-243. doi: 10.1095/biolreprod.-102.007799
71. **Rocha JC, Passalia F, Matos FD, Maserati MP, Alves MF, Almeida TG, Cardoso BL, et al. 2016.** Methods for assessing the quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard? *JBRA Assist Reprod* 20: 150-158. doi: 10.5935/1518-0557.20160033
72. **Roper DA, Schrick FN, Edwards JL, Hopkins FM, Prado TM, Wilkerson JB, Saxton A, et al. 2018.** Factors in cattle affecting embryo transfer pregnancies in recipient animals. *Anim Reprod Sci* 199: 79-83. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.11.001
73. **Rosenkrans CF Jr, Zeng GQ, MCNamara GT, Schoff PK, First NL. 1993.** Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 49: 459-462. doi:10.1095/biolreprod49.3.459
74. **Samardzija M, Karadjole M, Matkovic M, Cergolj M, Getz I, Dobranic T, Tomaskovic A, et al. 2006.** A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Anim Reprod Sci* 91: 237-247. doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.04.005

75. **Sanbuissho A, Threlfall WR. 1990.** The influence of serum and gonadotropins on *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 34: 341-348. doi:10.1016/0093-691x(90)90527-z
76. **Smetanina IG, Tatarinova LV, Krivokharchenko AS. 2014.** Effects of hormones on *in vitro* maturation of cattle oocytes. *Bull Exp Biol Med* 157: 634-636. doi: 10.1007/s10517-014-2632-8
77. **Smith GD, Monteiro da Rocha A. 2012.** Advances in embryo culture systems. *Semin Reprod Med* 30: 214-221. doi:10.1055/s-0032-1311523
78. **Stewart-Savage J. 1993.** Effect of bovine serum albumin concentration and source on sperm capacitation in the golden hamster. *Biol Reprod* 49: 74-81. doi: 10.1095/biolreprod49.1.74
79. **Stival C, Puga Molina Ldel C, Paudel B, Buffone MG, Visconti PE, Krapf D. 2016.** Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 220: 93-106. doi: 10.1007/978-3-319-30567-7_5
80. **Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. 2003.** Effects of *in-vivo* and *in-vitro* environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update* 9: 35-48. doi: 10.1093/humupd/dmg009
81. **Thomas WK, Seidel GE. 1993.** Effects of cumulus cells on culture of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J Anim Sci* 71: 2506-2510. doi: 10.2527/1993.7192506x
82. **van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Fex Svenningsen A, Honegger P, Knudsen LE, Lindl T, et al. 2010.** Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicol In vitro* 24: 1053-1063. doi: 10.1016/j.tiv.2010.03.016
83. **Van Soom A, Mateusen B, Leroy J, De Kruif A. 2003.** Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? *Reprod Biomed Online* 7: 664-670. doi: 10.1016/s1472-6483(10)62089-5.
84. **Van Soom A, Tanghe S, De Pauw I, Maes D, de Kruif A. 2002.** Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod Domest Anim* 37: 144-151. doi: 10.1046/j.1439-0531.2002.00345.x
85. **van Wagtendonk-de Leeuw AM. 2006.** Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* 65: 914-925. doi:10.1016/j.theriogenology.-2005.09.007
86. **Voronina E, Wessel GM. 2003.** The regulation of oocyte maturation. *Curr Top Dev Biol* 58: 53-110. doi: 10.1016/s0070-2153(03)58003-6
87. **Witt KD, Beresford L, Bhattacharya S, Brian K, Coomarasamy A, Cutting R, Hooper R, et al. 2016.** Hyaluronic acid binding sperm selection for assisted reproduction treatment (HABSelect): study protocol for a multicentre randomised controlled trial. *BMJ Open* 6: e012609. doi: 10.1136/bmjopen-2016-012609
88. **Wood TC, Wildt DE. 1997.** Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts *in vitro*. *J Reprod Fertil* 110: 355-360. doi: 10.1530/jrf.0.1100355
89. **Wu B, Zan L. 2012.** Enhance beef cattle improvement by embryo biotechnologies. *Reprod Domest Anim* 47: 865-871. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01945.x
90. **Xia J, Ren D. 2009.** The BSA-induced Ca²⁺ influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent. *Reprod Biol Endocrinol* 7: 119. doi: 10.1186/1477-7827-7-119

91. **Xu J, Guo Z, Su L, Nedambale TL, Zhang J, Schenk J, Moreno JF, et al. 2006.** Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized *in vitro* with sex-sorted sperm. *J Dairy Sci* 89: 2510-2518. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72326-8
92. **Yang BK, Yang X, Foote RH. 1994.** Early Development of IVM/IVF bovine embryos cultured with or without somatic cells in a simple serum-free medium with different concentrations of CO₂ and O₂. *J Reprod Develop* 40: 197-205. doi: 10.1262/jrd.40.197