



La reconstitución de demi-embriones: un factor a considerar para el buen éxito de la bisección de embriones. Revisión



Alfredo Lorenzo-Torres ^a

Raymundo Rangel-Santos ^{a*}

Agustín Ruíz-Flores ^a

Demetrio Alonso Ambríz-García ^b

^a Universidad Autónoma Chapingo, Posgrado en Producción Animal. Carretera México- Texcoco, Km 38.5, 56230. Texcoco, Estado de México, México.

^b Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biología de la Reproducción, Ciudad de México, México.

*Autor de correspondencia: rangelsr@correo.chapingo.mx

Resumen:

Durante muchos años se ha intentado incrementar la eficiencia reproductiva del ganado utilizando biotecnologías como la bisección de embriones. Sin embargo, pese a su potencial en el ganado, su nivel de adopción es limitado. Este trabajo reseña la importancia de la reconstitución de los demi-embriones después de la bisección y los principales factores que limitan su éxito en el ganado. El uso de esta técnica podría ser más generalizado si se incrementara su eficiencia, lo cual podría lograrse mediante una selección más precisa de los embriones que se someterán a bisección. La calidad de los embriones es uno de los factores más importantes que determinan su potencial de reconstituirse en demi-embriones viables después de la bisección, permitiendo obtener resultados más confiables en los programas de transferencia de embriones.

Palabras clave: Bisección embrionaria, Reconstitución de demi-embriones, Desarrollo embrionario.

Recibido: 07/01/2021

Aceptado: 15/07/2021

Introducción

La bisección embrionaria es una biotecnología reproductiva que permite obtener demi-embriones idénticos para ser utilizados en la investigación⁽¹⁾ o en la industria ganadera⁽²⁾. El propósito de la bisección embrionaria es incrementar el número de demi-embriones disponibles para transferencia y, por ende, de las crías de animales genéticamente superiores^(1,3,4). Esta técnica se puede aplicar a embriones desarrollados en la etapa de mórula o de blastocisto y consiste en obtener dos mitades similares mediante la bisección mecánica^(5,6,7). La bisección de la mórula puede realizarse en cualquier posición del embrión, debido a su morfología simétrica⁽⁸⁾. En el caso de los blastocistos, la orientación simétrica del embrión es importante para obtener una distribución proporcional de la masa celular interna (MCI) y el trofotodermo (TE) en los demi-embriones resultantes⁽⁹⁾.

La bisección embrionaria se lleva a cabo en embriones de diversas especies^(10,11,12) con la finalidad de incrementar la disponibilidad de embriones⁽¹²⁾, la tasa de embarazo⁽¹³⁾ y el número de crías^(5,14,15). Sin embargo, hay estudios en los que la supervivencia de los demi-embriones ha resultado ser baja^(16,17), incluso inferior a la que se obtuvo utilizando embriones completos⁽¹⁸⁾. Esto puede estar asociado con el hecho de que la bisección embrionaria es una técnica invasiva⁽⁶⁾ y el procedimiento ocasiona daño celular⁽¹⁹⁾. Por lo tanto, el éxito de la técnica podría verse influido por factores asociados al embrión original^(20,21,22) y su capacidad de reconstituirse en los demi-embriones que resultan de ella⁽²³⁾. El objetivo de esta reseña es subrayar la importancia de la reconstitución de los demi-embriones en los programas de bisección embrionaria, así como examinar los principales factores que influyen en su éxito.

Importancia de la bisección embrionaria en el ganado

La bisección embrionaria se ha practicado en diversas especies ganaderas de interés de, tales como conejos⁽¹⁹⁾, ovejas⁽²⁴⁾, bovinos⁽¹²⁾, cabras⁽¹⁰⁾, equinos⁽²⁵⁾, cerdos⁽²⁶⁾, e incluso se ha realizado en seres humanos⁽²²⁾. Si bien esta técnica es invasiva, es práctica y, a diferencia de la clonación, no requiere de una programación celular⁽⁶⁾. La bisección embrionaria en las especies ganaderas permite producir gemelos idénticos para uso experimental⁽¹⁴⁾, reduciendo el número de animales que se requieren por tratamiento para las pruebas de comparación⁽²⁷⁾ o para incrementar la disponibilidad de embriones transferidos⁽²⁸⁾. Además, la obtención de gemelos idénticos facilita la evaluación de los sementales o las pruebas de rasgos maternos⁽²⁹⁾, y permite mantener características deseables en el ganado⁽³⁾.

La bisección embrionaria ha permitido incrementar la tasa de embarazo⁽²⁹⁾ y el número de crías⁽¹³⁾, en comparación con la transferencia de embriones completos^(13,24). La mayoría de los autores han reportado disponibilidad de un elevado número de demi-embryones para transferencia en relación con el número de embriones bisectados, lo cual incrementa la eficiencia en el número de crías (Cuadro 1). Sin embargo, la eficiencia varía mucho (entre 75 y 118%), lo cual puede asociarse principalmente con factores relacionados con el embrión original. Las borregas exhibieron una tasa de embarazo del 64% cuando recibieron pares de demi-embryones, con lo que obtuvieron un 118% de eficiencia en cría⁽¹⁴⁾. Asimismo, el porcentaje de supervivencia de los embriones fue mayor cuando se transfirieron dos demi-embryones por receptora (101 %, 710/705), en comparación con la transferencia de dos embriones completos, considerando el número de embriones originales⁽²⁴⁾. Es más, la tasa de nacimientos obtenidos mediante la transferencia de pares de demi-embryones de ovejas superó en un 30% la lograda con embriones completos (85 vs 55 %, $P<0.05$)⁽³⁰⁾.

Cuadro 1: Eficiencia de la bisección embrionaria en la producción de crías en relación con el número de embriones bisectados

Especies	Embryones bisectados	Número de crías nacidas	Eficiencia (%)	Referencia
Bovina	36	27	75	13
Bovina	50	61*	105	15
Bovina	11	12*	109	5
Ovina	40	34	85	30
Ovina	24	21**	88	16
Ovina	705	710*	101	24
Ovina	16	17	106	31
Ovina	39	46	118	14

* Número de fetos diagnosticados por ultrasonido entre los 30 y los 80 días a partir de la gestación
 o **mediante cirugía post sacrificio. Eficiencia(%)= número de crías nacidas / embryones bisectados.

Por otra parte, en algunos estudios se obtuvo una eficiencia baja con la bisección embrionaria^(16,32,33). Se ha reportado el nacimiento de un porcentaje menor de ovejas después de la transferencia de embryones bisectados que después de la de embryones completos (27 vs 52 %, $P<0.05$)⁽³⁴⁾. Sin embargo, en el ganado bovino, pese a los problemas asociados con la gestación de gemelos⁽⁴⁾, la implementación de la bisección embrionaria representa un beneficio económico toda vez que incrementa el número de crías^(2,17,35). Por lo tanto, se puede implementar la bisección embrionaria en los programas de transferencia de embryones^(2,24).

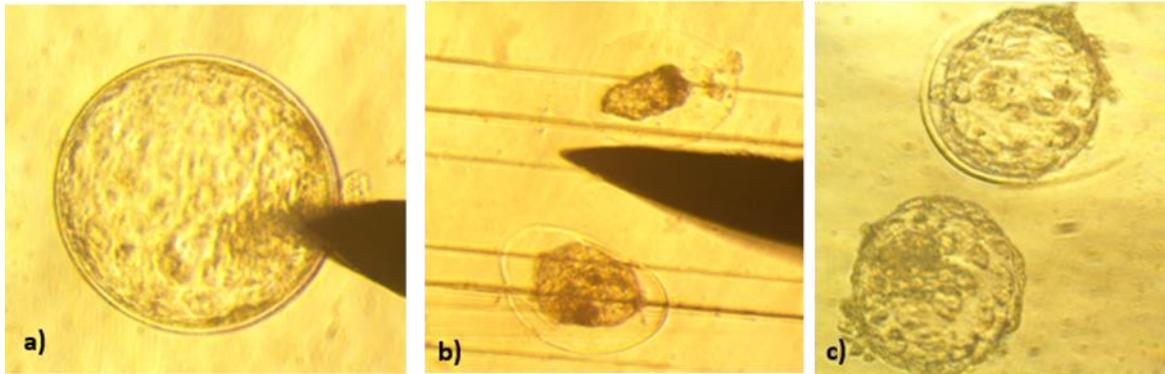
Reconstitución de los embriones después de la bisección

La reconstitución embrionaria es un indicador de la capacidad de los demi-embriones de convertirse en crías tras de ser transferidos a una hembra receptora^(18,29). En los tejidos adultos, las células madre son responsables de reparar las lesiones y regenerar los tejidos^(23,36) dañados por envejecimiento o enfermedades⁽³⁷⁾. En el caso de los embriones sucede algo similar cuando se remplazan las células especializadas que se han perdido a causa de alguna alteración⁽²³⁾. Los embriones son capaces de reparar sus lesiones, adaptándose a las condiciones ambientales a fin de sobrevivir después de su reconstitución⁽²³⁾. En las etapas tempranas, las células embrionarias se pueden adaptar en lo relativo tanto al índice mitótico como al proceso de diferenciación⁽³⁸⁾ debido a la plasticidad que presentan^(39,40). Además, se ha comprobado que los conglomerados de células embrionarias en etapas tempranas de su desarrollo pueden convertirse en organismos vivos mediante la reorganización de las células, como en el caso de la división del blastocisto⁽⁴¹⁾.

De manera que un grupo de células tiene propiedades que exceden la potencia de cualquier célula individual del grupo para la reconstitución celular, la cual podría ser un efecto conjunto⁽²³⁾. Las células extrudidas e incluso el detrito celular observado después de la bisección del embrión podrían contener suficientes células viables para proliferar y reorganizarse, dando lugar a otro embrión funcional⁽⁸⁾. Al momento de realizar la bisección embrionaria, las mitades resultantes se pueden cultivar *in vitro* durante 2 a 48 horas^(5,26). En cada demi-embrión se reorganiza la MCI, y de inmediato el blastocele comienza a reconstituirse^(5,29,42).

La unión de los bordes de las células trofoblásticas durante la bisección es responsable de la capacidad del trofoblasto de reconstituirse⁽⁵⁾, puesto que este grupo de células secreta líquido al blastocele; este proceso es regulado por los genes^(43,44) y permite la formación esférica de demi-embriones⁽⁴²⁾, siendo las células trofoblásticas importantes para la implantación del embrión⁽⁴⁵⁾. Del mismo modo, aun cuando un embrión haya perdido la mitad de sus células, sigue siendo un organismo, y una característica de los organismos es que reparan sus lesiones, regenerándolas para continuar su desarrollo⁽²³⁾. En el laboratorio se ha biseccionado blastocistos expandidos de ovejas producidos *in vitro* con una microcuchilla (Figura 1a), utilizando el procedimiento denominado estriado en placa⁽⁴⁶⁾ (Figura 1b), y se observó una reconstitución completamente esférica (70% del tamaño del embrión original) después de 12 horas de cultivo *in vitro* (Figura 1c).

Figura 1: Proceso de bisección embrionaria y reconstitución de los demi-embriones después de 12 horas de cultivo *in vitro*



a) Blastocisto expandido orientado simétricamente con respecto a la microcuchilla de bisección, b) demi-embriones resultantes, y c) demi-embriones reconstituidos. $\times 200$.

Diversos autores han reportado un porcentaje de reconstitución que oscila entre 90 y 178 % (Cuadro 2).

Cuadro 2: Eficiencia de la reconstitución de demi-embriones bovinos después de 2-48 horas de cultivo *in vitro* posteriormente a la bisección

Embriones bisectados	Número de demi-embriones	Reconstitución* (%)	Referencia
21	19	90	29
11	16	145	5
176	268	152	12
19	30	158	47
230	408	178	28

*Reconstitución (%) = Número de demi-embriones / embriones bisectados.

La evaluación de la reconstitución embrionaria podría permitir la selección de demi-embriones viables y ser una herramienta útil para los programas de transferencia embrionaria⁽¹⁸⁾.

Factores que afectan la reconstitución de los demi-embriones

Técnica de bisección embrionaria

La bisección embrionaria es una técnica que permite la producción de gemelos idénticos en los programas de transferencia embrionaria⁽⁵⁾. En los años 1980 esta técnica requería de hasta seis instrumentos de manipulación y bisección de embriones⁽⁵⁾. Sin embargo, con el tiempo se han desarrollado diversas metodologías para simplificar la técnica⁽¹⁾, dado que el

procedimiento requería de hasta 15 min para bisectar un embrión⁽⁴⁸⁾. Además, se ha estudiado ampliamente el uso de instrumentos cortantes, como la microcuchilla^(5,25,49) o la aguja de vidrio^(50,51,52), con el objeto de minimizar el daño celular al momento de realizar el corte⁽⁵³⁾. Así, el éxito de la técnica depende de que se produzca el mínimo daño a los embriones⁽¹⁹⁾, dado que el procedimiento genera entre 10 y 13 % de la pérdida de células^(47,54).

A este respecto, se ha demostrado que el método de bisección embrionaria con microcuchilla es práctica y que tiene aplicación en condiciones de campo⁽¹⁾. Se ha simplificado la implementación de mediante la presión vertical en el momento de la bisección embrionaria, utilizando una microcuchilla adaptada a un micromanipulador único, sin emplear una micropipeta de sujeción de embriones^(12,15,34). En el laboratorio se ha observado que el uso de la técnica de estriado en placa⁽⁴⁶⁾ con 50 µl de un medio comercial de bisección facilita la fijación de los embriones y previene la adhesión de las células a los materiales de bisección y de cultivo. Esto permite bisectar grupos de cinco embriones en aproximadamente 3 minutos, lo que hace que la aplicación de esta biotecnología resulte más práctica y evite someter a los embriones a un estrés prolongado.

Por otra parte, hay evidencias que demuestran que la técnica utilizada para la bisección embrionaria influye en la respuesta productiva. En los ovinos se ha evaluado el efecto del técnico en el momento de la bisección, y se ha encontrado una diferencia significativa entre los dos técnicos en la tasa de embarazo (66 vs 75 %, $P<0.05$) y en la supervivencia de los demi-embriones (51 vs 44 %, $P<0.01$)⁽⁵⁵⁾. Por ello, es necesario tomar en cuenta la capacitación del técnico antes de implementar la bisección embrionaria.

Etapa del desarrollo

La etapa del desarrollo embrionario —mórula, blastocisto temprano o blastocisto expandido— en el momento de la bisección es uno de los factores más importantes que afectan la tasa de embarazo de los embriones transferidos. Después de bisectar embriones de ratones se encontró que en la etapa de mórula los demi-embriones se reconstituyen en un porcentaje más bajo que en la etapa de blastocisto (74 vs 90 %, $P=0.001$) después de 24 horas de cultivo *in vitro*⁽⁴⁵⁾. En el ganado bovino, no se reportaron diferencias significativas en la tasa de embarazo (51-65 %, $P>0.1$) cuando se transfirieron demi-embriones de mórulas, blastocistos tempranos o blastocistos expandidos⁽⁵³⁾. En otro estudio se obtuvo una tasa de embarazo más baja con el uso de mórulas bisectadas (7/44, 16 %) comparadas con los blastocistos tempranos (58/96, 60 %), $P<0.01$ ⁽⁸⁾. De manera similar, se ha reportado un porcentaje superior de fetos viables después de la bisección de blastocistos en comparación con las mórulas 91 (10/11) vs 30 % (3/10), $P<0.05$, al día 70 a partir de la gestación⁽⁴⁷⁾. Por último, en los ovinos se obtuvieron seis pares de gemelos idénticos a partir de la bisección de blastocistos, mientras que la bisección de las mórulas no fue exitosa ($P<0.05$)⁽¹⁶⁾.

En términos prácticos, parece ser que la bisección de mórulas es más fácil debido a la simetría morfológica que presentan; sin embargo, en el laboratorio se observó que la bisección de blastocistos expandidos e incluso de blastocistos eclosionados fue más fácil una vez que se identificaron con claridad la MCI y el TE. Es más, algunos autores han reportado una tasa de embarazo más elevada utilizando blastocistos que con el uso de mórulas (Cuadro 3), quizá porque son más tolerantes a la manipulación y se ven menos afectados por la pérdida de la zona pelúcida^(8,54). Esto puede deberse al hecho de que la embriogénesis está estrictamente regulada en lo relativo al tiempo⁽²²⁾ y a que entre más desarrollados están los embriones más tolerantes son.

Cuadro 3: Efecto de la etapa de desarrollo del embrión completo en la tasa de embarazo de demi-embriones transferidos

Especies	Etapa de desarrollo, % (n)			Referencia
	Mórula	Blastocisto	Blastocisto expandido	
Caprina	0 (5)	33 (9)	55 (11)*	10
Ovina	60 (20)	88 (24)	-	16
Bovina	48 (162)	60 (96)	54 (28)	8
Bovina	51 (71)	64 (61)	58 (12)	53
Bovina	39 (139)	36 (33)	30 (10)	12

% = Tasa de embarazo; n = Número de hembras receptoras; *Blastocisto eclosionado.

Calidad del embrión

Existe una amplia evidencia del uso de embriones de excelente calidad para fines de bisección^(12,40,56,57). Los embriones seleccionados para la bisección deben satisfacer ciertos criterios morfológicos, de los cuales dependerá el éxito de la reconstitución de los demi-embriones⁽²⁸⁾ y, en consecuencia, también la tasa de embarazo^(12,51). La calidad de los embriones debe ser excelente o buena, dependiendo de los criterios morfológicos⁽⁵⁸⁾, porque cuando son de baja calidad (regular o mala) son más vulnerables al proceso de bisección^(12,47).

En los bovinos, cuando se bisectaron mórulas, se obtuvo un porcentaje más elevado de supervivencia en el grupo de calidad buena y excelente, en comparación con las mórulas de calidad regular y mala, 167 (20/12) vs 75% (9/12), $P < 0.00$ ⁽⁴⁷⁾. Por otra parte, se encontró en las vacas una tasa de embarazo de 42% después del descongelamiento y con la transferencia de demi-embriones de calidad excedente, mientras que cuando se transfirieron demi-embriones provenientes de embriones de baja calidad no se lograron gestaciones⁽⁵¹⁾. Asimismo, se reportó un mayor porcentaje de desarrollo en pares de demi-embriones cuando se bisectaron embriones bovinos de calidad excelente, en comparación con los de buena calidad (76 vs 40 %, $P < 0.05$)⁽¹²⁾. Por lo tanto, para obtener resultados positivos se debe tomar

en cuenta la evaluación de la calidad de los embriones que se someten a la bisección. Sin embargo, la evaluación morfológica de los embriones sometidos a bisección es un aspecto subjetivo basado en la experiencia de los investigadores.

En estudios realizados por nuestro grupo de trabajo con la manipulación de embriones ovinos se encontró un porcentaje más elevado de reconstitución de demi-embryones (145 %, aproximadamente) cuando se biseccionaron embriones de calidad excelente y con un diámetro mayor de 230 μm . En los demi-embryones resultantes, después de 12 h de cultivo *in vitro* se encontró que, al reconstituirse, alcanzaron un diámetro promedio de $176 \pm 10.03 \mu\text{m}$ (Figura 2), similar al reportado en dos demi-embryones porcinos de alta calidad ($161.6 \pm 25.7 \mu\text{m}$)⁽²⁶⁾, pero mayor que el reportado en demi-embryones humanos ($121 \mu\text{m}$)⁽²²⁾. Por lo tanto, se ha propuesto el diámetro embrionario como indicador de calidad^(25,59), dado que el tamaño del embrión tiene un lugar importante en el reconocimiento materno⁽⁶⁰⁾.

Por otra parte, el tamaño del embrión también está asociado con el número de células⁽⁶¹⁾ y, en consecuencia, con la calidad del embrión. En los embriones de mala calidad, la tasa de división celular, es decir, de mitosis, es deficiente, y por ende lo es también el número de células⁽⁴⁷⁾. Así, el tamaño del embrión es proporcional al número de células utilizado para su reconstitución⁽²²⁾. Hay un 50 % de recuperación de células de los embriones originales en los demi-embryones resultantes, dependiendo de la calidad y la uniformidad del proceso de bisección^(26,28). Esto sugiere que la bisección de embriones de mayor tamaño producirá demi-embryones con más MCI y más células del TE, con lo cual se prolongará su supervivencia. En el laboratorio de este grupo de investigación se obtuvo un promedio de 68 ± 11.3 células en demi-embryones reconstituidos, después de 12 h de cultivo *in vitro* (Figura 3), a partir de embriones con 122 ± 6.6 células. En este sentido, la proliferación de células activas puede ser un criterio de calidad embrionaria⁽⁶²⁾. Con base en lo anterior, el diámetro del embrión podría ser un criterio objetivo para seleccionar embriones para la bisección con el objeto de lograr el mayor éxito posible en la reconstitución de demi-embryones.

Figura 2. Reconstitución *in vitro* de demi-embryones después de 12 h de cultivo. $\times 200$

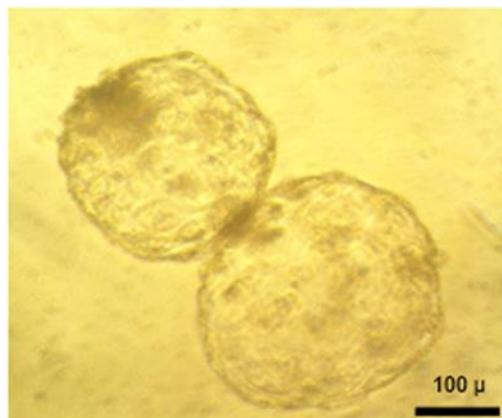
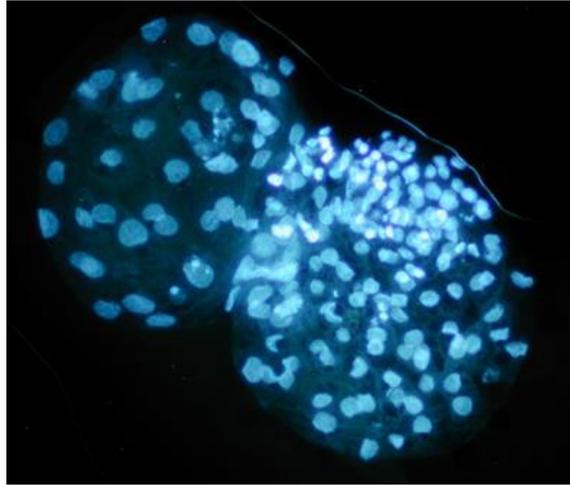


Figura 3. Tinción celular (Hoechst) de demi-embriones *in vitro* después de 12 h de cultivo. $\times 200$



Embriones producidos *in vitro* o *in vivo*

Existen diferencias entre los embriones producidos *in vitro* o *in vivo* en su morfología y en sus componentes moleculares⁽⁶³⁾, de los cuales los embriones producidos *in vivo* son de mejor calidad. No obstante, se ha reportado un elevado porcentaje de supervivencia *in vitro* de demi-embriones ovinos después de la bisección (80-85 %) y una tasa de preñez del 33 % después de la transferencia de pares de demi-embriones a borregas receptoras (5/15)⁽³⁴⁾. Por otra parte, algunos autores han reportado tasas de gestación más altas para los embriones producidos *in vivo*. Se reportó un alto porcentaje de reconstitución (47/60, 78.3 %)⁽¹⁵⁾ en los embriones bovinos biseccionados producidos *in vivo* y en los demi-embriones cultivados *in vitro*⁽¹⁸⁾. Así, la eficiencia de la bisección embrionaria en relación con el origen del embrión parece ser inferior en los embriones producidos *in vitro*. Esto podría deberse a la baja calidad y a la baja eficiencia de la producción *in vitro*⁽⁶³⁾. Por ello es necesario mejorar la eficiencia en ambos procedimientos de producción de embriones, toda vez que ambos se enfocan en mejorar la productividad en la producción ganadera⁽⁶⁴⁾.

Efecto de la raza y edad de las donadoras de embriones para bisección

Hay otros factores poco estudiados que podrían afectar el destino del embrión bajo el proceso de bisección. En los ovinos, se evaluó el efecto de la raza sin encontrar diferencias significativas en la tasa de gestación y en la supervivencia de demi-embriones entre los embriones de las razas Gotland y Texel finlandesa (69 vs 50 % y 42 vs 26 %, respectivamente, $P > 0.05$) ni entre las razas Texel danesa y Texel finlandesa (74 vs 74 % y 50 vs 50 %, respectivamente, $P > 0.05$)⁽⁵⁵⁾. Además, se ha reportado el efecto de la edad de la donante sin que se hallaran diferencias en la tasa de gestación entre los embriones generados en hembras

adultas (de 24 meses de edad) y en hembras jóvenes (de aproximadamente 10 meses de edad) (74 vs 74 %, $P>0.05$); sin embargo, la supervivencia de los demi-embriones (51 vs 47, $P<0.05$) y el porcentaje de gemelos idénticos fueron más elevados en las borregas adultas que en las jóvenes (38 vs 27, $P<0.01$)⁽⁵⁵⁾. Esto podría estar relacionado con una menor capacidad de supervivencia de los embriones completos provenientes de borregas jóvenes^(65,66,67), confirmada después de la transferencia de demi-embriones⁽⁵⁵⁾.

Conclusiones

La reconstitución de demi-embriones es un factor clave para el éxito de la bisección embrionaria, y su máxima eficiencia se obtiene seleccionando embriones de excelente calidad, independientemente de su etapa de desarrollo. Los resultados de la literatura demuestran el potencial de la técnica de bisección; de ahí que deba considerarse su aplicación para mejorar la eficiencia de los programas de transferencia embrionaria.

Literatura citada:

1. Godke RA, Sansinena M, Youngs CR. Assisted reproductive technologies and embryo culture methods for farm animals. In: Pinkert CA editor. Transgenic Animal Technology: A Laboratory handbook. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier; 2014:581-638.
2. Praharani L. Factors affecting twinning and the impacts of twinning in cattle. WARTAZOA Indones Bull Anim Vet Sci 2019;29(1):13-24.
3. Yang X, Tian XC, Kubota C, Page R, Xu J, Cibelli J, *et al.* Risk assessment of meat and milk from cloned animals. Nat Biotechnol 2007;25(1):77-83.
4. Wakchaure R, Ganguly S. Twinning in cattle: A Review. ARC J Gynecol Obstet 2016;1(4):1-3.
5. Ozil JP. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. Reproduction 1983;69(2):463-468.
6. Escriba MJ, Valbuena D, Remohí J, Pellicer A, Simon C. New techniques on embryo manipulation. J Reprod Immunol 2002;55(1-2):149-161.
7. Tang HH, Tsai YC, Kuo CT. Embryo splitting can increase the quantity but not the quality of blastocysts. Taiwan J Obstet Gynecol 2012;51(2):236-239.
8. Williams TJ, Elsdon RP, Seidel Jr GE. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. Theriogenology 1984;22(5):521-531.
9. Illmensee K, Levanduski M. Embryo splitting. Middle East Fertil Soc J 2010;15(2):57-63.

10. Tsunoda Y, Tokunaga T, Sugie T, Katsumata M. Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goats. *Theriogenology* 1985;24(3):337-343.
11. Ramón UJ, Meza VV, Deneb CP, Domínguez RA, Quintal FJ. Bisection and embryo transfer in hair sheep. *Biotechnology Summit 2012, Mérida, Yucatán, México 2012*;12-21(3):138-142.
12. Hashiyada Y. The contribution of efficient production of monozygotic twins to beef cattle breeding. *J Reprod Develop* 2017;63(6):527-538.
13. Dahlen CR, DiCostanzo A, Spell AR, Lamb GC. Use of embryo transfer seven days after artificial insemination or transferring identical demi-embryos to increase twinning in beef cattle. *J Anim Sci* 2012;90(13):4823-4832.
14. Chesne P, Colas G, Cognie Y, Guerin Y, Sévellec C. Lamb production using superovulation, embryo bisection, and transfer. *Theriogenology* 1987;27(5):751-757.
15. Saito S, Niemann H. *In vitro* and *in vivo* survival of bovine demi-embryos following simplified bisection and transfer of one or two halves per recipient. *J Reprod Develop* 1993;39(3):251-258.
16. Shelton JN. Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demi-embryos. *Theriogenology* 1992;37(3):713-721.
17. Echtenkamp SE, Gregory KE. Reproductive, growth, feedlot, and carcass traits of twin vs single births in cattle. *J Anim Sci* 2002;80:E64-E73.
18. Alvarez RH, Pires RML, Campanha A, Oba E. Short-term culture of bovine bisected embryos. Effects on pregnancy rates, sex ratio and birth weight of calves. *B Indústr Anim* 2008;65(3):191-196.
19. Skrzyszowska M, Smorag Z, Katska L. Demi-embryo production from hatching of zona-drilled bovine and rabbit blastocysts. *Theriogenology* 1997;48(4):551-557.
20. Reichenbach HD, Schwartz J, Wolf E, Brem G. Effects of embryo developmental stage, quality and short-term culture on the efficiency of bovine embryo splitting. *Theriogenology* 1998;1(49):224.
21. Kawachiya S, Bodri D, Shimada N, Kato K, Takehara Y, Kato O. Blastocyst culture is associated with an elevated incidence of monozygotic twinning after single embryo transfer. *Fertil Steril* 2011;95(6):2140-2142.

22. Noli L, Ogilvie C, Khalaf Y, Ilic D. Potential of human twin embryos generated by embryo splitting in assisted reproduction and research. *Hum Reprod* 2017;23(2):156-165.
23. Condic ML. Totipotency: what it is and what it is not. *Stem Cells Dev* 2014;23(8):796-812.
24. Vivanco HW, Rangel SR, Lynch P, Rhodes A. Large scale commercial application of bisection of sheep embryos. *Theriogenology* 1991;35(1):292.
25. McKinnon AO, Carnevale EM, Squires EL, Carney NJ, Seidel Jr GE. Bisection of equine embryos. *Equine Vet J* 1989;21(Suppl 8):129-133.
26. Reichelt B, Niemann H. Generation of identical twin piglets following bisection of embryos at the morula and blastocyst stage. *Reproduction* 1994;100(1):163-172.
27. Yang X, Anderson GB. Micromanipulation of mammalian embryos: principles, progress and future possibilities. *Theriogenology* 1992;38(2):315-335.
28. Rho GJ, Johnson WH, Betteridge KJ. Cellular composition and viability of demi-and quarter-embryos made from bisected bovine morulae and blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology* 1998;50(6):885-895.
29. Baker RD, Shea BF. Commercial splitting of bovine embryos. *Theriogenology* 1985;23(1):3-12.
30. Vintila I, Bencsik I, Pacala N, Corin N, Babusik I, Kulickova L. Embryo splitting- a way to increase the efficiency of embryo-transfer in sheep. *Stočarstvo: Časopis za unapređenje stočarstva* 1995;49(9-12):349-353.
31. Széll A, Hudson RHH. Factors affecting the survival of bisected sheep embryos *in vivo*. *Theriogenology* 1991;36(3):379-387.
32. Shelton JN, Szell A. Survival of sheep demi-embryos *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology* 1988;30(5):855-863.
33. Harkness UF, Crombleholme TM. Twin–twin transfusion syndrome: where do we go from here? *Semin Perinato* 2005;29(5):296-304.
34. Morton KM, Rowe AM, Maxwell WC, Evans G. *In vitro* and *in vivo* survival of bisected sheep embryos derived from frozen-thawed unsorted, and frozen-thawed sex-sorted and refrozen-thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 2006;65(7):1333-1345.
35. De Rose EP, Wilton JW. Productivity and profitability of twin births in beef cattle. *J Anim Sci* 1991;69(8):3085-3093.

36. Kenyon J, Gerson SL. The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells. *Nucleic Acids Res* 2007;35(22):7557-7565.
37. Maynard S, Fang EF, Scheibye-Knudsen M, Croteau DL, Bohr VA. DNA damage, DNA repair, aging, and neurodegeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015;5(10):a025130.
38. Deuchar EM. Regeneration of amputated limb-buds in early rat embryos. *Development* 1976;35(2):345-354.
39. Cenariu M, Pall E, Cernea C, Groza I. Evaluation of bovine embryo biopsy techniques according to their ability to preserve embryo viability. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012.
40. De Sousa RV, da Silva Cardoso CR, Butzke G, Dode MAN, Rumpf R, Franco MM. Biopsy of bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro* does not affect pregnancy rates. *Theriogenology* 2017;90:25-31.
41. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. In: Martin U. editor. *Engineering of stem cells*. Heidelberg, Berlín, Alemania: Springer; 2009;114:185-199.
42. Daniel Jr JC. Some kinetics of blastocyst formation as studied by the process of reconstitution. *J Exp Zool* 1963;154(2):231-237.
43. Watson AJ, Barcroft LC. Regulation of blastocyst formation. *Front Biosci* 2001;6:D708-D730.
44. Watson AJ, Natale DR, Barcroft LC. Molecular regulation of blastocyst formation. *Anim Reprod Sci* 2004;82:583-592.
45. Wang ZJ, Trounson A, Dziadek M. Developmental capacity of mechanically bisected mouse morulae and blastocysts. *Reprod Fertil Dev* 1990;2(6):683-691.
46. Bredbacka P. Biopsy of morulae and blastocysts. *Reprod Domest Anim* 1991;26(2):82-84.
47. McEvoy TG, Sreenan JM. Effect of embryo quality and stage of development on the survival of zona pellucida-free cattle demi-embryos. *Theriogenology* 1990;33(6):1245-1253.
48. Yang X, Foote RH. Production of identical twin rabbits by micromanipulation of embryos. *Biol Reprod* 1987;37(4):1007-1014.
49. Lopes RFF, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology* 2001;56(9):1383-1392.

50. Willadsen SM, Godke RA. A simple procedure for the production of identical sheep twins. *Vet Rec* 1984;114(10):240-243.
51. Niemann H, Brem G, Sacher B, Smidt D, Kräusslich H. An approach to successful freezing of demi-embryos derived from day-7 bovine embryos. *Theriogenology* 1986;25(4):519-524.
52. Seike N, Saeki K, Utaka K, Sakai M, Takakura R, Nagao Y, *et al.* Production of bovine identical twins via transfer of demi-embryos without zonae pellucidae. *Theriogenology* 1989;32(2):211-220.
53. Kippax IS, Christie WB, Rowan TG. Effects of method of splitting, stage of development and presence or absence of zone pellucida on foetal survival in commercial bovine embryo transfer of bisected embryos. *Theriogenology* 1991;35(1):25-35.
54. Skrzyszowska M, Smorag Z. Cell loss in bisected mouse, sheep and cow embryos. *Theriogenology* 1989;32(1):115-122.
55. Rangel-Santos R. Investigations into procedures for the implementation of a multiple ovulation and embryo transfer scheme using ewe lambs [PhD thesis]. Wellington, New Zealand: Massey University; 1991.
56. Shea BF. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six-year retrospective study. *Theriogenology* 1999;51(4):841-854.
57. Lopatarova M, Cech S, Krontorad P, Holy L, Hlavicova J, Dolezel R. Sex determination in bisected bovine embryos and conception rate after the transfer of female demi-embryos. *Vet Med* 2008;53(11):595-603.
58. Stringfellow DA, Seidel G. *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 2nd. IETS 1990;19.
59. Mori M, Otoi T, Suzuki T. Correlation between the cell number and diameter in bovine embryos produced *in vitro*. *Reprod Domest Anim* 2002;37(3):181-184.
60. Goff AK. Embryonic signals and survival. *Reprod Domest Anim* 2002;37(3):133-139.
61. O'Hara L, Forde N, Kelly AK, Lonergan P. Effect of bovine blastocyst size at embryo transfer on Day 7 on conceptus length on Day 14: can supplementary progesterone rescue small embryos? *Theriogenology* 2014;81(8):1123-1128.
62. Makarevich AV, Markkula M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. *Biol Reprod* 2002;66(2):386-392.

63. Camargo LSDA, Viana JHM, Sá WFD, Ferreira ADM, Ramos ADA, Vale Filho VR. Factors influencing *in vitro* embryo production. *Anim Reprod* 2006;3(1):19-28.
64. Paramio MT. *In vivo* and *in vitro* embryo production in goats. *Small Ruminant Res* 2010;89(2-3):144-148.
65. Quirke JF, Hanrahan JP. Comparison of the survival in the uteri of adult ewes of cleaved ova from adult ewes and ewe lambs. *Reproduction* 1977;51(2):487-489.
66. McMillan WH, McDonald MF. Survival of fertilized ova from ewe lambs and adult ewes in the uteri of ewe lambs. *Anim Reprod Sci* 1985;8(3):235-240.
67. Morton KM. Developmental capabilities of embryos produced *in vitro* from prepubertal lamb oocytes. *Reprod Domest Anim* 2008;43(Suppl 2):137-143.