

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES BOVINOS CRIOPRESERVADOS: EFECTO DE LA BLASTOCENTESIS

TRANSFER OF CRYOPRESERVED BOVINE EMBRYOS: EFFECT OF BLASTOCENTESIS

Oscar E. Zárate-Guevara¹, Jadiel L. Cisneros-Prado¹, Rodolfo Canseco-Sedano¹,
Felipe Montiel-Palacios^{1*}, Apolo A. Carrasco García¹

¹Universidad Veracruzana, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Circunvalación s/n
Esquina Yáñez, Colonia Unidad Veracruzana. Veracruz, Veracruz, México. (fmontiel@uv.mx).

RESUMEN

La tasa de gestación obtenida con embriones bovinos criopreservados por curva lenta (CL) y por vitrificación (VT) no supera el 40 %; por lo tanto, se buscan alternativas para incrementarla, como la blastocentesis (Blx), que resulta en tasa de sobrevivencia post-descongelación en embriones de humanos y ratones ≥ 70 %. La hipótesis fue que la tasa de gestación (TG) post-transferencia de embriones bovinos producidos *in vivo* criopreservados con o sin blastocentesis, es mayor cuando se criopreservan por VT que cuando se criopreservan por CL. El objetivo fue determinar el efecto del método de criopreservación (CR) y de la Blx sobre la tasa de gestación post-transferencia de embriones bovinos producidos *in vivo*. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 2², con tamaño de muestra de 100 embriones producidos *in vivo*, y los factores fueron la CR y la Blx con 25 repeticiones por tratamiento: T1) CL, T2) VT, T3) CL+Blx, y T4) VT+Blx. La ovulación se sincronizó en las receptoras a través de progesterona natural (CIDR-B[®]) para realizar transferencia de embriones a tiempo fijo y el diagnóstico de gestación se realizó 45 d post-transferencia. La variable de respuesta fue la TG por tratamiento y se analizó por el método de χ^2 para determinar la homogeneidad entre las proporciones de los tratamientos. La TG general obtenida fue 34 %. La TG fue mayor con embriones VT (64 %) que con embriones CL (8 %), sin previa Blx ($p \leq 0.05$). La Blx aumentó la TG en embriones CL (T1: 8 % y T3: 44 %; $p \leq 0.05$) y la disminuyó en embriones VT (T2: 64 % y T4: 20 %; $p \leq 0.05$). La VT y la Blx son alternativas para aumentar la TG en programas de transferencia de embriones en bovinos.

Palabras clave: biotecnología, vitrificación, bovino, trópico.

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2018. Aprobado: julio, 2018.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 52: 21-32. 2018.

ABSTRACT

Pregnancy rate obtained with bovine embryos cryopreserved by slow curve (CL) and vitrification (VT) do not exceed 40 %; therefore, the search continues for other alternatives to increase pregnancy rate, such as blastocentesis (Blx), which results in a post-thawing survival rate in human and mice embryos of ≥ 70 %. The hypothesis was that the post-transfer gestation rate (TG) of cryopreserved bovine embryos produced *in vivo*, with or without blastocentesis, is higher for embryos cryopreserved by VT than for those cryopreserved by CL. The objective was to determine the effect of the cryopreservation (CR) and the Blx method on the post-transfer gestation rate of bovine embryos produced *in vivo*. The experimental design was a completely randomized 2² factorial arrangement, with sample size of 100 embryos produced *in vivo*, and the factors were CR and Blx with 25 repetitions per treatment: T1) CL, T2) VT, T3) CL+Blx, and T4) VT+Blx. Ovulation was synchronized in the recipients through natural progesterone (CIDR-B[®]) to perform embryo transfer at a fixed time and the diagnosis of pregnancy was made 45 d post-transfer. The response variable was the TG per treatment and it was analyzed by the χ^2 method to determine the homogeneity of the proportions in treatments. The general TG obtained was 34 %. TG was higher with VT embryos (64 %) than with CL embryos (8 %), without previous Blx ($p \leq 0.05$). The Blx increased TG in CL embryos (T1: 8 % and T3: 44 %; $p \leq 0.05$) and decreased in VT embryos (T2: 64 % and T4: 20 %; $p \leq 0.05$). VT and Blx are alternatives to increase TG in bovine embryo transfer programs.

Keywords: biotechnology, vitrification, bovine, tropic.

INTRODUCTION

Embryo transfer (TE) is an implemented technique in genetic bovine breeding programs to obtain a greater offspring from high-value donors (Martínez and Valcárcel, 2008). In addition,

INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones (TE) es una técnica implementada en los programas de mejoramiento genético bovino para obtener un mayor número de crías de donadoras de alto valor (Martínez y Valcárcel, 2008). Además, la criopreservación de los embriones no transferidos en fresco permite tenerlos disponibles por tiempo indefinido para su transferencia o comercialización (Cabrera y Fernández, 2006). En 2009, el 56.7 % de embriones bovinos (producidos *in vivo* e *in vitro*) transferidos en Europa fueron embriones criopreservados (AETE, 2010).

Los métodos más utilizados para criopreservar embriones bovinos son la curva lenta y la vitrificación. El primero se elige para embriones producidos *in vivo* y las tasas de gestación obtenidos post-transferencia (35-55 %) son ligeramente inferiores (Chase *et al.*, 2009; Ledezma *et al.*, 2011) a las obtenidas al transferir embriones frescos (50-60 %) (Lopes *et al.*, 2001). El segundo método de criopreservación de embriones permite el paso de líquido a sólido sin la formación de cristales de hielo intracelulares (Vajta y Kuwayama, 2006). La vitrificación es una alternativa para la preservación de embriones con porcentajes óptimos de viabilidad; además, es una técnica sencilla, de fácil ejecución, costo-eficiente y con tasas de gestación aceptables (35-65 %) (Cabrera *et al.*, 2006; Youngs, 2011; Hasler, 2014).

La blastocentesis, una técnica aplicada a blastocistos, consiste en reducir de manera artificial el volumen del blastocele con micromanipuladores, una microaguja, una micropipeta de sujeción y un microscopio invertido (Motoishi, 2000). En el día 7 el embrión bovino se conoce como blastocisto y tiene una cavidad central llena de fluido llamada blastocele; los blastocistos expandidos tienen mayor cantidad de líquido en comparación con los blastocistos tempranos. Sin embargo, a medida que el desarrollo continúa se da lugar a un blastocisto expandido, el cual se caracteriza por un aumento en el tamaño debido al aumento en la cantidad de líquido en el blastocele, por lo que la masa celular interna se compacta y las células del trofoblasto se pegan a la zona pelúcida, la cual se adelgaza (Mapletoft *et al.*, 2002).

Cuando los blastocistos en estadios de desarrollo avanzado (blastocisto expandido) se exponen a la vitrificación, se obtienen tasas de sobrevivencia

criopreservación permite que los embriones no sean transferidos en fresco, sino que estén disponibles indefinidamente para su transferencia o comercialización (Cabrera y Fernández, 2006). En 2009, 56.7 % de embriones bovinos (producidos *in vivo* e *in vitro*) transferidos en Europa fueron criopreservados (AETE, 2010).

Los métodos más utilizados para criopreservar embriones bovinos son la curva lenta y la vitrificación. El primero se elige para embriones producidos *in vivo* y las tasas de gestación obtenidos post-transferencia (35-55 %) son ligeramente inferiores (Chase *et al.*, 2009; Ledezma *et al.*, 2011) a las obtenidas al transferir embriones frescos (50-60 %) (Lopes *et al.*, 2001). El segundo método de criopreservación de embriones permite el paso de líquido a sólido sin la formación de cristales de hielo intracelulares (Vajta y Kuwayama, 2006). La vitrificación es una alternativa para la preservación de embriones con porcentajes óptimos de viabilidad, y es una técnica sencilla, de fácil ejecución, costo-eficiente y con tasas de gestación aceptables (35-65 %) (Cabrera *et al.*, 2006; Youngs, 2011; Hasler, 2014).

La blastocentesis, una técnica aplicada a blastocistos, consiste en reducir de manera artificial el volumen del blastocele con micromanipuladores, una microaguja, una micropipeta de sujeción y un microscopio invertido (Motoishi, 2000). En el día 7 el embrión bovino se conoce como blastocisto y tiene una cavidad central llena de fluido llamada blastocele; los blastocistos expandidos tienen mayor cantidad de líquido en comparación con los blastocistos tempranos. Sin embargo, a medida que el desarrollo continúa se da lugar a un blastocisto expandido, el cual se caracteriza por un aumento en el tamaño debido al aumento en la cantidad de líquido en el blastocele, por lo que la masa celular interna se compacta y las células del trofoblasto se pegan a la zona pelúcida, la cual se adelgaza (Mapletoft *et al.*, 2002).

Cuando los blastocistos en estadios de desarrollo avanzado (blastocisto expandido) se exponen a la vitrificación, se obtienen tasas de sobrevivencia

criopreservación permite que los embriones no sean transferidos en fresco, sino que estén disponibles indefinidamente para su transferencia o comercialización (Cabrera y Fernández, 2006). En 2009, 56.7 % de embriones bovinos (producidos *in vivo* e *in vitro*) transferidos en Europa fueron criopreservados (AETE, 2010).

alrededor de 35 % (Cho *et al.*, 2002). La blastocentesis es una técnica novedosa, por lo cual no hay información de su utilización en embriones bovinos previo a su criopreservación,

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del método de criopreservación y de la blastocentesis sobre la tasa de gestación posttransferencia de embriones bovinos producidos *in vivo*. La hipótesis fue que la tasa de gestación (TG) post-transferencia de embriones bovinos producidos *in vivo* criopreservados con o sin blastocentesis, es mayor cuando se criopreservan por VT que cuando se criopreservan por CL.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características del área de estudio

Este estudio se realizó en una unidad de producción bovina en el municipio de Medellín de Bravo, en el estado de Veracruz (19° 03' N, 96° 09' O), a 52 msnm, clima cálido-húmedo-extremoso con temperatura promedio de 25.3 °C y precipitación pluvial anual de 1417.8 mm (Mijares *et al.*, 1988).

Características y manejo de las receptoras

Para realizar la transferencia de embriones se utilizaron 100 receptoras bovinas (*Bos primigenius taurus* × *Bos primigenius indicus*). Las receptoras tuvieron las siguientes características: 1) condición corporal de 4 a 7 en escala del 1 al 9, donde 1 es emaciado y 9 es obeso (Richards *et al.*, 1986); 2) no estar bajo ningún tratamiento farmacológico; 3) mostrar actividad ovárica y tener cérvix adecuado para la transferencia embrionaria según diagnóstico por palpación vía transrectal; y 4) estar clínicamente sanas.

La alimentación de las receptoras se basó en pastoreo semi-extensivo rotacional de *Brachiaria brizantha* y un suplemento con concentrado comercial (19 % PC), 2 kg vaca⁻¹ d⁻¹, por 30 d antes y 30 d después de la transferencia, así como sales minerales con mayor biodisponibilidad biológica de fósforo *ad libitum*. El manejo sanitario fue vacunación contra clostridiasis (Ultrabac 7[®], Zoetis, México), diarrea viral bovina, rinotraqueítis infecciosa bovina y parainfluenza tipo 3 (Bovi Shield Gold FP[®], Zoetis, México), y la desparasitación contra parásitos pulmonares y gastrointestinales (Dectomax[®], Zoetis, México), y baños garrapaticidas (Gamitraz[®], Zoetis, México). Siete días previos al inicio de la sincronización de la ovulación cada receptora recibió vía intramuscular (IM) 10 mL de fósforo (Tonofosfán Compositum[®], MSD, México), 8 mL de selenio (Mu-Se[®], MSD, México) y 5 mL de vitamina A, D, E (Vigantol[®], Bayer, México).

cryopreserved with or without blastocentesis, is higher when embryos are cryopreserved by VT than those cryopreserved by CL.

MATERIALS AND METHODS

Characteristics of the study area

This study was carried out in a bovine production unit in the municipality of Medellín de Bravo, in the state of Veracruz (19° 03' N, 96° 09' W), at 52 masl, with an extreme warm-humid climate, average temperature of 25.3 °C and annual rainfall of 1417.8 mm (Mijares *et al.*, 1988).

Characteristics and management of the receivers

To perform embryo transfer, we used 100 receptive cross-breed bovine females (*Bos primigenius taurus* × *Bos primigenius indicus*). The recipients had the following characteristics: 1) body condition from 4 to 7 on a scale of 1 to 9, where 1 is emaciated and 9 is obese (Richards *et al.*, 1986); 2) not being under any pharmacological treatment; 3) show ovarian activity and an adequate cervix for embryo transfer according to diagnosis by transrectal palpation; and 4) be clinically healthy.

Feeding of the recipients was based on semi-extensive rotational grazing of *Brachiaria brizantha* and a supplement with commercial concentrate (19 % CP), 2 kg cow⁻¹ d⁻¹, for 30 d before and 30 d after the transfer, as well as mineral salts with greater biological bioavailability of phosphorus *ad libitum*. The sanitary management was vaccination against clostridiasis (Ultrabac7[®], Zoetis, Mexico), bovine viral diarrhea, infectious bovine rhinotracheitis and Type 3 parainfluenza (Bovi Shield Gold FP[®], Zoetis, Mexico), and deworming against pulmonary and gastrointestinal parasites (Dectomax[®], Zoetis, Mexico), as well as anti-tick baths (Gamitraz[®], Zoetis, Mexico). Seven days prior to the starting of synchronization of ovulation each recipient received intramuscular (IM) 10 mL of phosphorus (Tonofosfán Compositum[®], MSD, Mexico), 8 mL of selenium (Mu-Se[®], MSD, Mexico) and 5 mL of A, D, and E vitamins (Vigantol[®], Bayer, Mexico).

Synchronization of ovulation in recipients

In all recipients, ovulation was synchronized by a progesterone releasing intravaginal device (CIDR-B[®]; Zoetis, Mexico) and on Day 0, IM application of 2 mg of estradiol benzoate (Bioestrogen[®]; Biogenesis Bagó, Argentina). On Day 5, 400 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG; Folligon[®]; MSD, Mexico) was applied *via* IM and 25 mg of dinoprost tromethamine (Lutalyse[®];

Sincronización de la ovulación en receptoras

En todas las receptoras se sincronizó la ovulación mediante un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (CIDR-B[®]; Zoetis, México) y la aplicación vía IM de 2 mg de benzoato de estradiol (Bioestrogen[®]; Biogenesis Bagó, Argentina) el Día 0. El día 5 se aplicó vía IM 400 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG; Folligon[®]; MSD, México) y 25 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse[®]; Zoetis, México). El día 8 se retiró el CIDR-B[®] y se administró vía IM 1 mg de cipionato de estradiol (E.C.P.[®], Zoetis, México) (Bó *et al.*, 2004).

Embriones

Un banco con 100 blastocistos expandidos producidos *in vivo* de bovinos Brangus se asignaron al azar a cuatro tratamientos: T1 criopreservación por curva lenta sin blastocentesis (n=25; CL), T2 vitrificación sin blastocentesis (n=25; VT), T3 criopreservación por curva lenta con blastocentesis (n=25; Blx+CL), y T4 vitrificación con blastocentesis (n=25; Blx+VT), según el procedimiento de Vanderzwalmen *et al.*, 2002). Los 50 restantes se vitrificaron (T2=VT) según el método Cryotop[®] (Kuwayam, 2007) usando etilenglicol (Sigma-Aldrich[®], Darmstadt, Alemania), dimetilsulfóxido (Sigma) y sucrosa (Sigma-Aldrich[®], Darmstadt, Alemania). Similarmente solo 25 contaron con blastocentesis (T4=Blx+VT). Los embriones se almacenaron a -196°C en nitrógeno líquido (N₂L) hasta su utilización.

Criopreservación de blastocistos

Curva lenta

La preparación de los embriones antes de la congelación consistió en colocarlos en un plato de Petri de 35×10 mm (Nunc[®], Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA) con medio de congelación compuesto por solución *buffer* fosfatada (PBS; Fisher BioReagents[®], Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA) más 1.5 M de etilenglicol (EG, Sigma-Aldrich[®], Darmstadt, Alemania) a temperatura ambiente (20-22 °C) durante 10 a 30 min (Wright, 1985). Luego, los embriones se cargaron en pajillas de 0.25 mL con tapa (hasta tres blastocistos por pajilla), se rotularon, se introdujeron en una congeladora automática (*Freeze Control*, modelo CL 5500, Cryologic[®], Australia) cargada con N₂L, se esperó 2 min para estabilizarse y después se indujo el *seeding* en cada pajilla con una pinza de metal enfriada en N₂L. Una vez logrado el *seeding* la congeladora se programó en la función correspondiente a la congelación de embriones de bovino. El programa inició con -6°C , después de 10 min comenzó a

Zoetis, Mexico). On Day 8, CIDR-B[®] was withdrawn and 1 mg of estradiol cypionate (ECP[®], Zoetis, Mexico) was administered *via* IM (Bó *et al.*, 2004).

Embryos

A bank with 100 expanded blastocysts produced *in vivo* from Brangus bovines were randomly assigned to four treatments: T1) slow curve cryopreservation without blastocentesis (n=25; CL), T2) vitrification without blastocentesis (n=25; VT), T3) cryopreservation by slow curve with blastocentesis (n=25; Blx+CL), and T4) vitrification with blastocentesis (n=25; Blx+VT) according to the procedure established by Vanderzwalmen *et al.*, 2002). The remaining 50 embryos were vitrified (T2=VT) by the Cryotop[®] method (Kuwayam, 2007) using ethylene glycol (Sigma-Aldrich[®], Darmstadt, Germany), dimethyl sulfoxide (Sigma) and sucrose (Sigma-Aldrich[®], Darmstadt, Germany). Similarly, only 25 had blastocentesis (T4=Blx+VT). The embryos were stored at -196°C in liquid nitrogen (N₂L) until their use.

Cryopreservation of blastocyst

Slow curve

The preparation of the embryos before freezing consisted of placing them in a 35×10 mm Petri dish (Nunc[®], Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) with freezing medium composed of phosphate *buffer* solution (PBS, Fisher BioReagents[®], Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) plus 1.5 M ethylene glycol (EG, Sigma-Aldrich[®], Darmstadt, Germany) at room temperature (20-22 °C) for 10 to 30 min (Wright, 1985). Then, the embryos were loaded in 0.25 mL straws with a lid (up to three blastocysts per straw), labeled, stored in an automatic freezer (*Freeze Control*, model CL 5500, Cryologic[®], Australia) loaded with N₂L, after waiting for 2 min to stabilize and then the *seeding* was induced in each straw with a metal clamp cooled in N₂L. Once the *seeding* was achieved, the freezer was programmed in the function corresponding to the freezing of bovine embryos. The program started with -6°C , after 10 min temperature began to fall at a rate of $0.5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ until it reached -32°C , at which time the embryos were taken out of the freezer and transferred to a cryogenic thermos with N₂L where they were stored until their transfer (Arreseigor *et al.*, 1998).

Vitrification

To vitrify the embryos it was used an equilibrium solution (ES) composed of PBS (Fisher BioReagents[®], Thermo Fisher Scientific

bajar $0.5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta llegar a $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$, momento desde el cual los embriones se sacaron de la congeladora y se transfirieron a un termo criogénico con N_2L donde se almacenaron hasta su transferencia (Arreseigor *et al.*, 1998).

Vitrificación

Para vitrificar los embriones se usó solución de equilibrio (ES) compuesta por PBS (Fisher BioReagents[®], Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA) más 20 % de sustituto sintético de suero (SSS, Irvine Scientific[®] Santa Ana, CA, EUA), 7.5 % de EG (Sigma-Aldrich[®], Darmstadt, Alemania) y 7.5 % de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich[®], Darmstadt, Alemania), y solución de vitrificación (VS) compuesta de PBS más 20 % de SSS más 15 % de EG, 15 % de DMSO y 0.5 M de sacarosa (Sigma-Aldrich[®], Darmstadt, Alemania). En un plato de Petri de $35\times 10\text{ mm}$ (Nunc[®], Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA) se colocaron una gota de ES y cuatro gotas de VS de $20\text{ }\mu\text{L}$ cada una; luego, los embriones se introdujeron en la gota de ES durante 5 a 15 min, se pasaron a las cuatro gotas de VS y se mantuvieron 5, 5, 10 y 10 s en cada gota, respectivamente, e inmediatamente después de sacarlos de la última gota (menos de 30 s en total) se colocaron en dispositivos Cryotop[®], éstos se introdujeron en un termo criogénico con N_2L y se almacenaron hasta su transferencia (Kuwayama *et al.*, 2005).

Blastocentesis

Un microscopio invertido se usó (Nikon[®] Instruments Inc, Japón) y un micromanipulador equipado con una pipeta de sujeción o *holding* (Narishige[®], Japón) con extremo distal romo, diámetro externo de $60\text{ }\mu\text{m}$ e interno de $20\text{ }\mu\text{m}$ y ángulo de 30° , y con una microaguja PZD (Partial Zona Dissection[®], Gothenburg, Suecia) con diámetro de $11\text{ }\mu\text{m}$, longitud de 60 mm y ángulo de 30° .

Antes de la criopreservación, los blastocistos se colocaron en una gota de $20\text{ }\mu\text{L}$ de PBS cubierta con aceite mineral para realizar la blastocentesis; con el microscopio invertido y los micromanipuladores, se inmovilizó el blastocisto con la micropipeta de sujeción con la masa celular interna dirigida a las 12 o 6, según las manecillas del reloj para evitar dañarlo, luego se perforó con la microaguja la zona pelúcida y se esperaron 2 min o hasta que saliera la máxima cantidad de blastocele (Hiraoka *et al.*, 2004).

Descongelamiento de blastocistos

Descongelación para curva lenta

Para descongelar los blastocistos criopreservados por CL, se sacó la pajilla del N_2L , se mantuvo 10 s a temperatura ambiente

Inc., MA, USA) plus 20 % synthetic serum substitute (SSS, Irvine Scientific[®] Santa Ana, CA, USA), 7.5 % of EG (Sigma-Aldrich[®], Darmstadt, Germany) and 7.5 % of dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich[®], Darmstadt, Germany), and vitrification solution (VS) composed of PBS plus 20 % SSS plus 15 % EG, 15 % DMSO and 0.5 M sucrose (Sigma-Aldrich[®], Darmstadt, Germany). In a $35\times 10\text{ mm}$ Petri dish (Nunc[®], Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) they were placed one ES drop and four VS drops of $20\text{ }\mu\text{L}$ each; then, the embryos were introduced into the ES drop for 5 to 15 min, then they were passed to the four VS drops, and after, embryos were maintained in each drop during 5, 5, 10 and 10s, respectively; immediately after removing them from the last drop (less than 30s in total) embryos were placed in Cryotop[®] devices, which were introduced in a cryogenic thermo with N_2L and stored until their transfer (Kuwayama *et al.*, 2005).

Blastocentesis

An inverted microscope was used (Nikon[®] Instruments, Inc., Japan) and a micromanipulator equipped with a holding pipette or *holding* (Narishige[®], Japan) with blunt distal end, external diameter of $60\text{ }\mu\text{m}$ and internal of $20\text{ }\mu\text{m}$ in an angle of 30° , and with a PZD microneedle (Partial Zone Dissection[®], Gothenburg, Sweden) with a diameter of $11\text{ }\mu\text{m}$, length of 60 mm and angle of 30° .

Before cryopreservation, the blastocysts were placed in a drop of $20\text{ }\mu\text{L}$ of PBS covered with mineral oil to perform the blastocentesis; with the inverted microscope and micromanipulators, the blastocyst was immobilized with the holding micropipette the internal cell mass directed at 12 or 6, clockwise to avoid damage to it, then the pellucid zone was punctured with the microneedle and wait 2 min or until the maximum amount of blastocoel was released (Hiraoka *et al.*, 2004).

Thawing blastocysts

Slow curve thawing

To thaw the cryopreserved blastocysts by CL, the straw was removed from the N_2L , maintained for 10 s at room temperature and immersed in water at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 45 s (Mucci *et al.*, 2005). After it was dried, one end of the straw was cut and placed in the embryo transfer applicator.

Heating of blastocysts

Vitrification heating

Because vitrification is a physical process different from freezing, it is necessary to define the meaning of the terminology

y se sumergió en agua a 37 °C durante 45 s (Mucci *et al.*, 2005). Después se secó, se cortó un extremo de la pajilla y se colocó en el aplicador de transferencia de embriones.

Calentamiento de blastocistos

Calentamiento para vitrificación

Dado que la vitrificación es un proceso físico diferente al de la congelación, se debe definir el significado de la terminología usada en este tema. Cuando se habla de llevar de nuevo el material biológico vitrificado a la temperatura ambiente de laboratorio, se usa el término “calentar” y no “descongelar” (Palma y Brem, 2008).

Para este proceso se utilizó: solución de calentamiento (TS), compuesta de PBS con SSS al 20 % más 1 M sacarosa; solución de dilución (DS) compuesta de PBS con SSS al 20 % más 0.5 M sacarosa; y solución de lavado (WS), compuesta de PBS con SSS al 20 %. Una gota de TS de 300 μ L se colocó en un plato de Petri a 37 °C y en otro plato se colocaron dos gotas de DS y tres gotas de WS de 20 μ L, cada una a temperatura ambiente. Para calentar los blastocistos se sacó el Cryotop[®] del N₂L, se destapó y se sumergió de inmediato en la gota de TS por 1 min. Después, los blastocistos se colocaron en las gotas DS por 3 min y consecutivamente se expusieron a la WS por 3 min en cada gota (Kuwayama *et al.*, 2005). Luego, los embriones se colocaron en PBS y se introdujeron en pajillas de 0.25 cc para su transferencia a receptoras.

Transferencia de embriones y diagnóstico de gestación

Esta transferencia se realizó solo en las receptoras que a la palpación transrectal presentaron un cuerpo lúteo bien implantado con diámetro mayor o igual a 1.5 cm 9 d después de haber retirado el CIDR-B[®]. Para realizar la transferencia la receptora recibió anestesia epidural (100 mg de lidocaína; Lidocaína[®], Lab. Intervet, México) 10 min antes del manejo. Además se realizó asepsia perivulvar con yodo y etanol. El aplicador de transferencia se cubrió con una funda estéril, se introdujo en la vagina, se pasó por el canal cervical mediante manipulación transrectal y se dirigió hacia el cuerno uterino con cuerpo lúteo, en el que se depositó el contenido de la pajilla en el tercio medio (Rowe *et al.*, 1980). Cada receptora recibió un embrión. El diagnóstico de gestación se realizó mediante ultrasonografía transrectal (Aloka SSD500 con un transductor convexo de 3.5 MHZ; Japón) 45 d después de la transferencia.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 2², el tamaño de muestra fue 100 embriones producidos

used in this topic. When talking about returning the vitrified biological material to the laboratory ambient temperature, the term “heating” is used instead of “thawing” (Palma and Brem, 2008).

For this process, the following was used: heating solution (TS), composed of PBS with 20 % SSS plus 1 M sucrose; dilution solution (DS) composed of PBS with 20 % SSS plus 0.5 M sucrose; and wash solution (WS), composed of PBS with 20 % SSS. One drop of 300 μ L of TS was placed in a Petri dish at 37 °C and in another dish two drops of DS and three drops of WS of 20 μ L were placed, each at room temperature. To heat the blastocysts, the Cryotop[®] was removed from the N₂L, uncovered and immersed immediately in the TS drop for 1 min. Then, the blastocysts were placed in the DS drops for 3 min and consecutively exposed to the WS for 3 min in each drop (Kuwayama *et al.*, 2005). Then, embryos were placed in PBS and stored in 0.25 cc straws for transferring to recipients.

Embryo transfer and pregnancy diagnosis

This transference was made only in the recipients who, after transrectal palpation, presented a well-impregnated *corpus luteum*, with a diameter greater than or equal to 1.5 cm 9 d after removing the CIDR-B[®]. To perform the transfer, the recipient received epidural anesthesia (100 mg of lidocaine, Lidocaine[®], Lab. Intervet, Mexico) 10 min before handling. In addition, perivulvar asepsis was performed with iodine and ethanol. The transfer applicator was covered with a sterile cover, was introduced into the vagina, passed through the cervical canal by transrectal manipulation and directed to the uterine trump with *corpus luteum*, in which the contents of the straw were deposited in the medium third of the uterine trump (Rowe *et al.*, 1980). Each recipient received an embryo. The pregnancy diagnosis was made by transrectal ultrasonography (Aloka SSD500 with a 3.5 MHZ convex transducer, Japan) 45d after transfer.

Statistical analysis

The experimental design was a completely randomized 2² factorial arrangement, the sample size was 100 embryos produced *in vivo*, and the factors were CR and Blx with 25 repetitions per treatments. The response variable was the gestation rate (TG) for the treatment of the transferred embryos, which was analyzed by the χ^2 test to determine the homogeneity between the proportions. The effect of the treatments on TG was evaluated by the Cochran and Mantel- Haenszel procedure ($p \leq 0.05$), in SPSS ver. 17.0.

in vivo, y los factores fueron la CR y la Blx con 25 repeticiones por tratamientos. La variable de respuesta fue la tasa de gestación (TG) por tratamiento de los embriones transferidos, la cual se analizó mediante la prueba χ^2 para determinar la homogeneidad entre las proporciones. El efecto de los tratamientos sobre TG se evaluó mediante el procedimiento de Cochran y Mantel-Haenszel ($p \leq 0.05$), lo cual se realizó con SPSS ver. 17.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respuesta de las receptoras a la sincronización de la ovulación

La ovulación se sincronizó en 167 hembras bovinas, de las cuales 149 (89.2 %) respondieron al presentar un cuerpo lúteo; sin embargo, para este estudio sólo 100 (59.9 %) recibieron un embrión, lo que representó 1.7 receptoras por embrión a transferir. El objetivo de mejorar la tasa de éxito en la TE es aumentar la proporción de receptoras adecuadas para que reciban un embrión y, por lo tanto, se han desarrollado protocolos capaces de sincronizar la ovulación a tiempo fijo (TF; Butler *et al.*, 2011), donde se elimina la necesidad de detección del estro. El uso de estos protocolos ofrece resultados satisfactorios (Fuentes y de la Fuente, 2007) al proporcionar receptoras ideales para la TE, con resultados de 52.5 (Nogueira *et al.*, 2004) hasta 88.6 % (Sales *et al.*, 2011). Por lo tanto, la eficiencia del protocolo de TETF usado en esta investigación (59.9 %) fue satisfactoria. Estos resultados confirmaron que el empleo combinado de un dispositivo intravaginal liberador de P4 natural (CIDR-B), estrógenos (BE y ECP), PGF_{2 α} y eCG como agentes hormonales pueden inducir la ovulación y proporcionar un número aceptable de hembras apropiadas para recibir un embrión, lo cual representa una herramienta importante en los programas de TE (Vasconcelos *et al.*, 2011).

Asimismo, se debe mencionar que la nutrición es un factor importante en el manejo de las receptoras ya que afecta todos los aspectos de la reproducción, por lo cual repercute en el éxito final de la TE. Por lo tanto, la receptora preñada debe recibir una buena alimentación, ya que gestará y amamantará a los becerros de mayor valor del hato (Alberio, 1993). Por ende, la condición corporal de las receptoras y el contenido energético, proteico y mineral de la alimentación que reciben son factores muy importantes. El cambio en la condición corporal (CC) entre el parto y la transferencia del embrión tiene estrecha relación con el

RESULTS AND DISCUSSION

Response of the recipients to the synchronization of ovulation

Ovulation was synchronized in 167 bovine females, of which 149 (89.2 %) responded when presenting a corpus luteum; however, for this study only 100 (59.9 %) received an embryo, which represented 1.7 recipients per embryo to be transferred. The goal of improving the success rate in TE is to increase the proportion of adequate recipients to receive an embryo and, therefore, protocols have developed capable of synchronizing ovulation at fixed time (TF; Butler *et al.*, 2011), where the need for estrus detection is eliminated. The use of these protocols offers satisfactory results (Fuentes and de la Fuente, 2007) by providing ideal recipients for TE, with results ranging from 52.5 (Nogueira *et al.*, 2004) to 88.6 % (Sales *et al.*, 2011). Therefore, the efficiency of the TETF protocol used in this research (59.9 %) was satisfactory. These results confirmed that the combined use of a natural P4-releasing intravaginal device (CIDR-B), estrogens (BE and ECP), PGF_{2 α} and eCG as hormonal agents are capable of inducing ovulation and providing an acceptable number of females suitable for receiving an embryo, which represents an important tool in TE programs (Vasconcelos *et al.*, 2011).

Likewise, it must be pointed out that nutrition is an important factor in the management of the recipients since it affects all aspects of reproduction, which has an impact on the final success of the TE. Therefore, the pregnant recipient should receive a good diet, since it will breed and nurse the calves with the highest value of the herd (Alberio, 1993). Thus, the body condition of the recipients and the energy, protein and mineral content of the food they receive are very important factors. The change in body condition (CC) between delivery and embryo transfer is closely related to the energy content of the food received by the recipient in that period. If there is a marked decrease in CC, the delivery-estrus interval and the gestation and delivery rates are affected. When referring to the scale of CC 1-5, it is necessary to achieve a rated 2.5 body condition at delivery, so that it does not result less than 2 at the time of transfer (Broadbent *et al.*, 1991). Then, the energy level must be correct, without excess, and it must continue until the implantation of the embryo

contenido energético del alimento que la receptora recibe en dicho período. Si hay una reducción marcada de la CC se afectan el intervalo parto-celo y las tasas de gestación y parición. Al tomar como referencia la escala de CC 1-5, es necesario lograr una CC 2.5 al parto para que ésta no sea inferior a 2 en el momento de la transferencia (Broadbent *et al.*, 1991). Luego, el nivel energético debe ser correcto, sin exceso, y debe continuar hasta que la implantación del embrión haya finalizado, y es determinante entre los días 21 y 45 de gestación (Sreenan y Diskin, 1987). Según Mapletoft *et al.* (1986) la mayor tasa de gestación se obtuvo con receptoras con CC entre 2 (53 %) y 3 (55 %), *versus* aquellas con $CC \leq 1$ (44 %) o ≥ 4 (47 %).

Tasa de gestación en receptoras con blastocistos bovinos producidos *in vivo*, criopreservados por curva lenta y por vitrificación

La TG por tratamientos para CL y VT fue 8 y 64 %, respectivamente ($p \leq 0.05$) (Cuadro 1). Al analizar cada tratamiento y sus interacciones se determinó que el número de hembras gestantes fue mayor cuando los embriones se criopreservaron por el método de VT que por el de CL, sin previa blastocentesis ($p \leq 0.05$). Así, el análisis de la razón de las ventajas indicó que las hembras que recibieron un embrión vitrificado tuvieron 20 oportunidades más de quedar gestantes, en contraste con aquellas que recibieron embriones congelados por CL con una certeza del 95 % (OR=20, IC_{95 %}: 4-107). Respecto a los métodos de congelación, las TG entre ellos no fue diferente (CL=26 % *versus* VT=42 %; $p=0.06$).

Nuestro estudio es de los primeros en reportar TG obtenidas para blastocistos bovinos producidos *in vivo*, criopreservados por CL o VT, ya que solo se habían realizado estudios en humanos, en quienes se contrastaron las tasas de ovocitos fertilizados *versus* blastocistos *in vitro*, criopreservados por CL (42.9 y 16.7 %), con las obtenidas por VT (71-100 y 29-36 %), respectivamente (Kuleshova y Lopata, 2002). Estos resultados situaron a la VT como una alternativa eficiente para obtener mayor viabilidad de embriones post-descongelamiento (Celestinos y Gatica, 2002). Al respecto, Stachecki *et al.* (2008) evaluaron la tasa de sobrevivencia post-vitrificación de blastocistos bovinos y humanos procedentes de ovocitos madurados *in vitro*, y los blastocistos bovinos (7 u 8 d) presentaban una masa celular interna (>100

has finished, and it is determinant between days 21 and 45 of gestation (Sreenan and Diskin, 1987). According to Mapletoft *et al.* (1986) the highest gestation rate was obtained with recipients with CC between 2 (53 %) and 3 (55 %), *versus* those with $CC \leq 1$ (44 %) or ≥ 4 (47 %).

Pregnancy rate in recipients with bovine *in vivo* produced blastocysts, cryopreserved by slow curve and vitrification

The TG for treatments for CL and VT was 8 and 64 %, respectively ($p \leq 0.05$) (Table 1). When analyzing each treatment and its interactions, it was determined that the number of pregnant females was higher when the embryos were cryopreserved by the VT method than by the CL method, without previous blastocentesis ($p \leq 0.05$). Thus, the analysis of the benefit ratio indicated that females that received a vitrified embryo had 20 more chances to become pregnant in contrast to those that received embryos frozen by CL with a certainty of 95 % (OR=20, IC_{95 %}: 4-107). Regarding the freezing methods, the TG among them was not different (CL=26 % *versus* VT=42 %, $p=0.06$).

Our study is one of the first to report TG obtained for bovine blastocysts produced *in vivo*, cryopreserved by CL or VT, since only studies in humans were carried out, in which the rates of fertilized oocytes *versus* blastocysts *in vitro*, cryopreserved by CL (42.9 and 16.7 %), were contrasted with those obtained by VT (71-100 and 29-36 %), respectively (Kuleshova and Lopata, 2002). These results identified the VT as an efficient alternative to obtain greater viability of post-thawing embryos (Celestinos and Gatica, 2002). In this regard, Stachecki *et al.* (2008) evaluated the post-vitrification survival rate of bovine and human blastocysts from oocytes matured *in vitro*, and bovine blastocysts (7 or 8 d) had an internal cell mass (>100 cells) well defined and intact, but not the human blastocysts (5 or 6 d) that were rejected for transfer because of the poor quality of their internal cell mass (<100 cells). However, after applying the vitrification technique in both, consistent survival rates of 96.1 and 83.3 % were obtained, as well as a higher rate of intact cells per embryo (93.6 and 86.4 %, respectively). These successful results in humans have been replicated in bovine research, demonstrating that the vitrified bovine blastocysts

Cuadro 1. Efecto del método de congelación y la blastocentesis sobre la tasa de gestación por tratamiento (preñez (P)/embrión transferido (ET)).
Table 1. Effect of the freezing method and blastocentesis on the pregnancy rate per treatment (pregnancy (P)/transferred embryo (ET)).

Tratamiento	P/ET (%)	χ^2 (p)	χ^2 Cochran y M-H. (p)
Curva lenta (CL)	8 (2/25) ^a	(p<0.001)	p>0.05
Vitrificación (VT)	64 (16/25) ^b	OR=20; IC ₉₅ % (4-107)	
CL+Blx	44 (11/25) ^{b,c}	(p=0.06)	
VT+Blx	20 (5/25) ^{a,c}	OR=0.3; IC ₉₅ % (0.09-1)	
Efectos principales			
Curva lenta (CL)	8 (2/25) ^a	(p=0.004)	p>0.05
CL+Blx	44 (11/25) ^{b,c}	OR=9; IC ₉₅ % (2-47)	
Vitrificación (VT)	64 (16/25) ^b	(p=0.002)	
VT+Blx	20 (5/25) ^{a,c}	OR=0.1; IC ₉₅ % (0.03-0.4)	

^{a,b,c} Superíndices diferentes indican diferencia estadística (p≤0.05). ❖ ^{a,b,c} Different superscripts indicate statistical difference (p≤0.05).

células) bien definida e intacta, no así los blastocistos humanos (5 o 6 d) que se rechazaron para transferencia a causa de la mala calidad de su masa celular interna (<100 células). Sin embargo, después de aplicar la técnica de vitrificación en ambos se obtuvieron tasas de supervivencia consistentes de 96.1 y 83.3 %, así como mayor tasa de células intactas por embrión (93.6 y 86.4 %, respectivamente). Estos resultados exitosos en humanos se han replicado en investigaciones en bovinos, al demostrar que los blastocistos bovinos vitrificados tienen mayor viabilidad y, por tanto, producen TG mayor (44-65 %, Hidalgo *et al.*, 2004; 57.4 %, CETA, 2010) que aquéllos preservados por el método de CL (14-21 %, Ariza *et al.*, 2006). Dichos resultados concuerdan con las TG de nuestro estudio (CL=8 % *vs.* VT=64 %). Resultados similares se obtuvieron con embriones humanos, y la TG fue mayor para blastocistos vitrificados (50.4 %) que para los congelados por CL (25.9 %). Estos resultados se suman para sugerir que la VT es una alternativa al procedimiento de CL y se asocia con una mayor tasa de sobrevivencia embrionaria, y en consecuencia mayor TG (Kué *et al.*, 2010).

Tasa de gestación en receptoras con blastocistos bovinos producidos *in vivo*, con o sin blastocentesis y criopreservados

La TG por tratamientos para CL+Blx y VT+Blx fue 44 y 20 %, respectivamente (p>0.05) (Cuadro 1). La Blx sí afectó la TG según el método de

have greater viability and, therefore, produce higher TG (44-65 %, Hidalgo *et al.*, 2004; 57.4 %, CETA, 2010) than those preserved by the CL method (14-21 %, Ariza *et al.*, 2006). These results agree with the TG of our study (CL=8 % *vs.* VT=64 %). Similar results were obtained with human embryos, and the TG was higher for vitrified blastocysts (50.4 %) than for those frozen by CL (25.9 %). These results add up to suggest that VT is an alternative to CL procedure and is associated with a higher embryo survival rate, and consequently higher TG (Kué *et al.*, 2010).

Pregnancy rate in recipients with bovine blastocysts produced *in vivo*, with or without blastocentesis and cryopreserved

The TG for treatments for CL+Blx and VT+Blx was 44 and 20 %, respectively (p>0.05) (Table 1). The Blx did affect the TG according to the cryopreservation method, since in recipients who received blastocysts cryopreserved by CL the TG was higher (CL=8 % *versus* CL+Blx=44 %, p≤0.05). The analysis of the benefit ratio indicated that females that received a blastocyst with Blx presented nine opportunities more to get pregnant than those who received one without Blx frozen by CL, with 95 % confidence (OR=9, IC₉₅ %: 2-47). However, in vitrified embryos Blx negatively affected TG (VT=64 % *versus* VT+Blx=20 %, p≤0.05). Similarly, when comparing the TG where Blx was not done (CL and VT) *versus* where it was done (CL+Blx and VT+Blx), no

criopreservación, ya que en receptoras que recibieron blastocistos criopreservados por CL la TG fue más alta (CL=8 % *versus* CL+Blx=44 %; $p \leq 0.05$). El análisis de la razón de las ventajas indicó que las hembras que recibieron un blastocisto con Blx presentaron nueve oportunidades más de quedar gestantes que aquéllas que recibieron uno sin Blx congelado por CL, con 95 % de confianza (OR=9, IC₉₅ %: 2-47). No obstante, en los embriones vitrificados la Blx afectó negativamente la TG (VT=64 % *versus* VT+Blx=20 %; $p \leq 0.05$). De manera similar, al comparar las TG en donde no se hizo Blx (CL y VT) *versus* donde sí se realizó (CL+Blx y VT+Blx), no se encontró diferencia (36 *versus* 32 %; respectivamente), lo cual indica que la blastocentesis favoreció la TG en los tratamientos ($p \leq 0.05$). La TG general obtenida fue 34 % (Cuadro 1).

La Blx es una técnica novedosa de la cual no había precedentes respecto a su efecto combinado con el método de criopreservación sobre las TG producidas por blastocistos bovinos. Pero en nuestro estudio se demostró que la Blx sí afectó la TG según el método de congelación usado y mayor cuando los embriones fueron criopreservados por CL, sin y con Blx (8 *vs.* 44 %), efecto contrario para los vitrificados sin y con Blx (64 *vs.* 20 %). Nuestros resultados son similares a los reportados por Papayannis *et al.* (2006) para embriones de ratón criopreservados por CL, sin y con Blx (9 *vs.* 39 %), pero en aquellos vitrificados no se encontró diferencia en TG (75 *vs.* 73 %). Por el contrario, Mukaida *et al.* (2006) reportaron un aumento significativo en las tasas de sobrevivencia (97.2 *vs.* 86 %) y preñez (60.2 *vs.* 34.1 %) para blastocitos humanos sometidos a reducción artificial del blastocele previo a su vitrificación, comparados con un grupo control únicamente vitrificado, respectivamente. De modo similar, Iwuayama *et al.* (2010) encontraron mayor TG con blastocitos humanos luego de realizar el colapso del blastocele con un pulso láser (59.7 % *versus* grupo testigo únicamente vitrificado (34.2 %). Es probable que la baja tasa de gestación obtenida en nuestra investigación en embriones vitrificados con Blx se relacione con el orificio abierto por la micro-aguja durante dicho procedimiento, que permitió el ingreso de crioprotectores en altas concentraciones al interior del embrión, lo que disminuyó la viabilidad celular, según Jim *et al.* (2011).

Por último, la tasa general de gestación (34 %) en nuestro estudio fue menor a la reportada por

difference was found (36 *versus* 32 %, respectively), which indicates that blastocentesis favored TG in the treatments ($p \leq 0.05$). The overall TG obtained was 34 % (Table 1).

The Blx is a novel technique of which there was no precedent regarding its combined effect with the cryopreservation method on TG produced by bovine blastocysts. But in our study, it was demonstrated that the Blx did affect the TG depending on the method of freezing used, and higher when embryos were cryopreserved by CL, without and with Blx (8 *vs.* 44 %), opposite effect for those vitrified without and with Blx (64 *vs.* 20 %). Our results are similar to those reported by Papayannis *et al.* (2006) for mouse embryos cryopreserved by CL, without and with Blx (9 *vs.* 39 %), but in those vitrified there was no difference in TG (75 *vs.* 73 %). Contrary to these results, Mukaida *et al.* (2006) reported a significant increase in survival (97.2 *vs.* 86 %) and pregnancy (60.2 *vs.* 34.1 %) rates for human blastocysts subjected to artificial reduction of the blastocoel prior to its vitrification, compared with a control group only vitrified, respectively. Similarly, Iwuayama *et al.* (2010) found higher TG with human blastocysts after performing the collapse of the blastocoel with a laser pulse (59.7 % *versus* control group only vitrified (34.2 %). It is likely that the low gestation rate obtained in our research in embryos vitrified with Blx was related to the microhole opened by the micro-needle during this procedure, which allowed the entry of cryoprotectants in high concentrations into the interior of the embryo, which decreased cell viability, as mentioned by Jim *et al.* (2011).

Finally, the general gestation rate (34 %) in our study was lower than that reported by Hernández *et al.* (2008) and Pontes *et al.* (2009). However, these variations obtained in the TG depend on factors related to the recipient and the cryopreservation by CL of the expanded blastocyst, which also decreased the general TG (Siqueira *et al.*, 2009; Berg *et al.*, 2010). The main factors correlated with pregnancy success are: embryo development, embryo quality, cryopreservation method, synchronization protocol, in addition to the technician who transfers the embryos (Chebel *et al.*, 2008). But, in our study only Quality 1 expanded blastocysts were used, their viability was evaluated after thawing and the technician who made the transfers was the same, so these factors probably did not affect the pregnancy outcomes.

Hernández *et al.* (2008) y Pontes *et al.* (2009). Sin embargo, estas variaciones obtenidas en las TG dependen de factores relacionados con la receptora y con la criopreservación por CL del blastocisto expandido, lo que también disminuyó la TG general (Siqueira *et al.*, 2009; Berg *et al.*, 2010). Los principales factores correlacionados con el éxito de la preñez son: desarrollo del embrión, calidad embrionaria, método de criopreservación, protocolo de sincronización, además del técnico que lo transfiere (Chebel *et al.*, 2008). Pero en nuestro estudio solo se usaron blastocitos expandidos calidad 1, se evaluó su viabilidad luego de su descongelación y el técnico que realizó las transferencias fue el mismo, por lo que estos factores probablemente no afectaron los resultados de gestación.

CONCLUSIONES

Los blastocitos bovinos producidos *in vivo* y criopreservados por vitrificación producen mayor tasa de gestación que aquellos criopreservados por congelamiento convencional lento. Sin embargo, la blastocentesis previa a la vitrificación en blastocitos bovinos no mejora su tasa de gestación, contrario a lo que sucede cuando se realiza la blastocentesis antes de la congelación por curva lenta, en cuyo caso sí favorece la tasa de gestación.

LITERATURA CITADA

- Alberio, R.H. 1993. Manejo de donantes y receptoras. *In*: Palma, G. A., y G. Brem. Transferencia de Embriones y Biotecnología de la Reproducción en la Especie Bovina. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 1ra. Edición, pp: 25-31.
- AETE. 2010. Statistic data of the bovine embryo transfer activity in Europe for 2010 *In*: Proceedings of the 16th AETE Scientific Meeting, Santander, España, pp: 27-69.
- Arreseigor, C. J., A. Sisul, A. E. Arreseigor, and R. C. Stahringer. 1998. Effect of cryoprotectant, thawing method, embryo grade and breed on pregnancy rates of cryopreserved bovine embryos. *Theriogenology* 49:160.
- Ariza L. E., W. Camacho, y C. A. Serrano-Novoa. 2006. Evaluación retrospectiva de la tasa de preñez obtenida por transferencia de embriones en diferentes cruces bovinos en el municipio de Puerto Araujo, Santander, Colombia (Retrospective analysis of pregnancy rate after embryo transfer on F1 cows). *Rev. Elec. Vet.* 7: 1-7.
- Berg D. K., J. Van Leeuwen, S. Beaumont, M. Berg, and P.L. Pfeffer. 2010. Embryo loss in cattle between days 7 and 16 of pregnancy. *Theriogenology* 73: 250-260.
- Bó, G. A., D. Moreno, L. Cutaia, M. Caccia, R. Tríbulo, y H. E. Tríbulo. 2004. Transferencia de embriones a tiempo fijo: tratamientos y factores que afectan los índices de preñez. *Taurus* 21: 25-45.

CONCLUSIONS

The bovine blastocysts produced *in vivo* and cryopreserved by vitrification produce a higher gestation rate than those cryopreserved by slow conventional freezing. However, blastocentesis prior to vitrification in bovine blastocysts does not improve their gestation rate, contrary to what happens when blastocentesis is performed before freezing by slow curve, in which case it does favor the gestation rate.

—End of the English version—



- Broadbent, P. J., M. Stewart, and D. F. Dolman. 1991. Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology* 35: 125-139
- Butler S. A., N. J. Phillips, G. B. Boe-Hansen, G. A. Bó, B. M. Burns, K. Dawson, and M. R. McGowan. 2011. Ovarian responses in *Bos indicus* heifers treated to synchronise ovulation with intravaginal progesterone releasing devices, oestradiol benzoate, prostaglandin F_{2a} and equine chorionic gonadotrophin. *Anim. Reprod. Sci.*, 129: 118-126.
- Cabrera, P. y A. Fernández. 2006. Criopreservación de embriones: una herramienta básica en la reproducción asistida. *Rev. Facultad de Ciencias Vet.* 47: 59-70.
- Cabrera, P., A. Fernández, P. Bastidas, M. Molina, A. Bethencourt, and T. Díaz. 2006. Vitrificación: una alternativa para la criopreservación de embriones. *Rev. Facultad de Ciencias Vet.* 47: 9-23.
- Celestinos M., y M. Gatica. 2002. Vitrificación como técnica de criopreservación de embriones bovinos. *Arch. Med. Vet.* 34: 157-165.
- Chase Jr, C. C., Vargas, C. A., Hammond, A. C., Olson, T. A., Griffin, J. L., C. N. Murphy, A. Tewolde, and M. J. Fields. 2009. Embryo transfer in Angus and Brahman recipient cows: Effect of two methods of estrus synchronization on induced estrus and pregnancy. *Rev. Cient.* 19: 630-638.
- Chebel R. C., D. G. B. Demétrio, and J. Metzger. 2008. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology* 69: 98-106.
- Cho, H. J., W. Y. Son, S. H. Yoon, S. W. Lee, and J. H. Lim. 2002. An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. *Hum. Reprod.* 17: 2419-2422.
- Cutini, A., M. Teruel, y J. Cabodevila. 2000. Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. *Taurus* 7: 28-39.
- Fuentes, S., y M. J. De la Fuente. 2007. Tasas de gestación de novillas receptoras, sincronizadas con gonadotropina coriónica equina u hormona foliculo estimulante. *Act. Sci. Vet.* 35: s767-s772.
- Hasler, J. 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* 81:152-169.
- Hidalgo C., E. Gómez, L. Prieto, P. Duque, F. Goyache, L. Fernández, I. Fernández, N. Facal, and C. Díez. 2004.

- Pregnancy rates and metabolic profiles in cattle treated with propylene glycol prior to embryo transfer. *Theriogenology* 62: 664-676.
- Hernández, C. W. S., H. Mendoza, J., V. Galina, G., A. Godoy, V., H. R. Ávila, V., y S. R. García. 2008. Reutilización de un dispositivo liberador de progesterona (CIDR-B) para sincronizar el estro en un programa de transferencia de embriones bovinos. *Rev. Mex. Ciencias Pec.* 46: 119-135.
- Hiraoka, K., K. Hiraoka, M. Kinutani, and K. Kinutani. 2004. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Human Reprod.* 19: 2884-2888.
- Iwuyama I., S. Hochi, and M. Yamashita. 2010. In vitro and in vivo viability of human blastocysts collapsed by laser pulse or osmotic shock prior to vitrification. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28: 355-361.
- Jim B., Y. Kawai, T. Hara, S. Takeda, S. Seki, Y.I. Nakata, K. Matsukawa, S. Koshimoto, M. Kasai, and K. Edashige. 2011. Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. *Biol. Reprod.* 85: 834-847.
- Kué P., A. Kuczyńska, B. Stankiewicz, P. Sieczyński, J. Matysiak, and W. Kuczyński. 2010. Vitrification vs. slow cooling protocol using embryos cryopreserved in the 5th or 6th day after oocyte retrieval and IVF outcomes. *Folia Histochem. Cryobiology* 48: 84-88.
- Kuleshova L., and A. Lopata. 2002. Vitrification can be more favourable than slow cooling. *Fertil. Steril.* 78: 449-454.
- Kuwayama M., G. Vajta, S. Ieda, and O. Kato. 2005. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod. Biomedicine online* 11: 608-614.
- Kuwayama, M. 2007. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Criotop method. *Theriogenology* 67: 73-80.
- Ledezma R., M. Camacho, F. Picón, G. Moreno, y J. Zárate. 2011. Efecto del CIDR aplicado en vacas de carne receptoras para transferencia de embriones sobre la tasa de preñez. *Ciencia UANL.* 14: 281-287.
- Lopes, R. F., F. Forell, A. T. Oliveira, and J. L. Rodrigues. 2001. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology* 56: 1383-1392.
- Mapletoft, R. J., C.E. Lindsell, and V. Pawlyshyn. 1986. Effects of Clenbuterol, body condition and non-surgical embryo transfer equipment on pregnancy rates in bovine recipients. *Theriogenology* 25:172.
- Mapletoft, R. J., K. B. Steward, and G. P. Adams. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 42: 601-611.
- Martínez, D., and A. Valcárcel. 2008. Vitrificación de embriones bovinos obtenidos in vitro. *Reproducción* 23: 21-33.
- Mijares, E. M., R. C. Ochoa, R. J. Antúnez y M. L. Hernández. 1998. *Enciclopedia Municipal Veracruzana.* Gobierno del Estado de Veracruz. pp: 12.
- Motoishi, M. 2000. Cryopreservation of human blastocyst. *J. Clin. Embryologist* 5: 6-14.
- Mucci N., J. F. Aller Atucha, J. A. Cabodevila, G. G. Kaiser, F. A. Hozbor, y R. H. Alberio. 2005. Criopreservación de embriones bovinos. *Taurus* 7: 20-35.
- Mukaida T., C. Oka, T. Goto, and K. Takahashi. 2006. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Hum. Reprod.* 21: 3246-3252.
- Nogueira M. F. G., D. S. Melo, L. M. Carvalho, E. J. Fuck, L. A. Trinca, and C. M. Barros. 2004. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2a and eCG? *Theriogenology* 61: 1283-1290.
- Palma G., y G. Brem. 2008. *Biología de la Reproducción.* Ed. INTA, Balcarce, Argentina. pp: 133-160.
- Papayannis M. M., V. Eyheremendy, C. Sanjurjo, J. Blaquier, y F. G. E. Raffo. 2006. Efecto de la remoción artificial del blastocoele en embriones murinos antes de su congelamiento o vitrificación. *FERTILAB, Medicina Reprod.* 1: 9-17.
- Pontes J. H. F., I. Nonato-Junior, B. V. Sanches, J. C. Ereno-Junior, S. Uvo, T. R. R. Barreiros, J. A. Oliveira, J. F. Hasler, and M. M. Seneda. 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.
- Richards, M. W., J. C. Spitzer, and M. B. Warner. 1986. Effect of varying levels of postpartum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 62: 300-306.
- Rowe, R. F., M. R. Del Campo, J. K. Critser, and O. J. Ginther. 1980. Embryo transfer in cattle: Nonsurgical transfer. *Am. J. Vet. Res.* 41: 1024-1028.
- Sales J. N. S., G. A. Crepaldi, M. W. Giroto, A. H. Souza, and P. S. Baruselli. 2011. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. *Anim. Rep. Sci.*, 124:12-18.
- Siqueira L. G.B., C. A. A. Torres, E. D. Souza, Jr. P. L. J. Monteiro, and E. K. N. Arashiro, L. S. A. Camargo, C. A. C. Fernandes, and J. H. M. Viana. 2009. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. *Theriogenology* 72: 949-958.
- Sreenan, J. M., and M. G. Diskin. 1987. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in cow. *Theriogenology* 27: 99-113.
- Stachecki J. J., J. Garrisi, S. Sabino, P. J. J. Caetano, K. E. Wiemer, and J. Cohen. 2008. A new safe, simple and successful vitrification method for bovine and human blastocysts. *Reprod. Biomed. online* 17: 360-367.
- Vajta, G., and M. Kuwayama, 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 65: 236-244.
- Vanderzwalmen P., G. Bertin, Ch. Debauche, V. Standaert, E. Roosendaal, M. Vandervorst, N. Bollen, H. Zech, T. Mukaida, K. Takahashi, and R. Schoysman. 2002. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoele cavity before vitrification. *Hum. Reprod.* 17: 744-751.
- Vasconcelos J. L., D. T. Jardina, O. G. Sá Filho, F. L. Aragon, and M. B. Veras. 2011. Comparison of progesterone-based protocols with gonadotropin-releasing hormone or estradiol benzoate for timed artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology* 75: 1153-1160.
- Wright, J.M. 1985. Commercial freezing of bovine embryos in straws. *Theriogenology* 23: 17- 29.
- Youngs, C. R. 2011. Cryopreservation of preimplantation embryos of cattle, sheep, and goats. *J. Visualized Exper.* 54: 2769-2770.