

# EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN Y DE LA BLASTOCELECTOMÍA SOBRE EL DESARROLLO *in vitro* DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *in vivo*

## EFFECT OF CRIOPRESERVATION AND BLASTOCELECTOMY ON *in vitro* DEVELOPMENT OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED *in vivo*

Oscar E. Zárate-Guevara<sup>1</sup>, Angélica Del R. Gil-Magaña<sup>1</sup>, Felipe Montiel-Palacios<sup>1</sup>, Rodolfo Canseco-Sedano<sup>1\*</sup>, Lorena López-de Buen<sup>1</sup>

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

### RESUMEN

La criopreservación (CR) es un procedimiento rutinario en biología, ganadería y medicina, y se logra por curva lenta (CL) y vitrificación (VT). La calidad, el estadio de desarrollo y la técnica de CR alteran la viabilidad de los embriones post-descongelados. La blastocelelectomía (Blx) se desarrolló para elevar la tasa de sobrevivencia de embriones criopreservados. La hipótesis de este estudio fue que el método de CR por vitrificación *versus* curva lenta alcanza una mayor tasa de eclosión (TE) *in vitro* de blastocistos bovinos (BB) con o sin blastocelelectomía. El objetivo fue determinar la TE *in vitro* para BB criopreservados por VT *versus* CL y con o sin Blx. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 2×2, y los factores fueron la CR y la Blx. En 30 embriones se realizó Blx y otros 30 embriones quedaron intactos; 50 % de cada grupo se criopreservó por CL y 50 % por VT (n=15, por tratamiento). Los embriones criopreservados por CL fueron expuestos a 1.5 M de etilenglicol por 10 a 30 min y congelados a velocidad de 0.5 °C min<sup>-1</sup> en una congeladora automática. La VT se realizó introduciendo los embriones en solución de equilibrio por 5 a 15 min, después se pasaron a cuatro gotas de solución de vitrificación y se mantuvieron 5, 5, 10 y 10 s en cada gota, respectivamente; luego se colocaron en Criotops® y se sumergieron en nitrógeno líquido. Después de descongelar y calentar, los blastocistos se cultivaron en medio IVC3™ con 10 % de sustituto sintético de suero por 72 h a 38.5 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 5 % de aire y 95 % de humedad. La TE se analizó por el método de  $\chi^2$  para determinar la homogeneidad entre las proporciones de los tratamientos. El efecto de BLX en la tasa de supervivencia y TE *in vitro* fue no significativo.

### ABSTRACT

Cryopreservation (CR) is a routine procedure in biology, livestock and medicine, and it is achieved with slow curve (CL) and vitrification (VT) procedures. The quality, stage of development and technique of CR alter the viability of post-thawed embryos. Blastocoelectomy (Blx) was developed to increase the survival rate of cryopreserved embryos. The hypothesis of this study was that the CR method by vitrification *versus* slow curve achieves a higher hatching rate (TE) *in vitro* of bovine blastocysts (BB) with or without blastocoelectomy. The objective was to determine the *in vitro* TE for BB cryopreserved by VT versus CL and with or without Blx. The experimental design was completely randomized with a 2×2 factorial arrangement, and the factors were CR and Blx. In 30 embryos Blx was performed and 30 other embryos remained intact; 50 % of each group was cryopreserved by CL and 50 % by VT (n=15, per treatment). Embryos cryopreserved by CL were exposed to 1.5 M ethylene glycol for 10 to 30 min and frozen at a speed of 0.5 °C min<sup>-1</sup> in an automatic freezer. The VT was performed by introducing the embryos in equilibrium solution for 5 to 15 min, then they were transferred to four drops of vitrification solution and kept 5, 5, 10 and 10 s in each drop, respectively; then they were placed in Criotops® and immersed in liquid nitrogen. After thawing and heating, the blastocysts were cultured in IVC3™ medium with 10 % of synthetic serum substitute for 72 h at 38.5 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 5 % air and 95 % humidity. The TE was analyzed by the  $\chi^2$  method to determine the homogeneity between the proportions of the treatments. The effect of Blx on the survival rate and TE *in vitro* was not significant. VT as CR method of BB produced *in vivo* allows higher survival rate and better post-thawing hatching rate than the CL freezing method.

\*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

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

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia*: 9-19, 2018.

Key words: slow curve, vitrification, *in vitro* culture.

**VT como método de CR de BB producidos *in vivo* permite tasa de supervivencia mayor y mejor tasa de eclosión post-descongelación que el método de congelación CL.**

**Palabras clave:** curva, lenta, vitrificación, cultivo, *in vitro*.

## INTRODUCCIÓN

La criopreservación de embriones es un método para la transferencia comercial de embriones. El número de embriones criopreservados y por su tiempo de supervivencia son crecientes, lo cual casi iguala a la tasa de supervivencia de embriones frescos (Shaw *et al.*, 2000). La criopreservación por curva lenta es un procedimiento lento que expone al embrión, en diferentes fases del congelamiento, a la acción de factores físicos, químicos y biológicos, con tasas de descenso de temperatura de  $0.5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta llegar a  $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$  para después sumergirlos en nitrógeno y conservarlos ahí por tiempo indefinido; el inconveniente es que el equipo es costoso y sofisticado (Lopatárová *et al.*, 2002).

La vitrificación es un método de criopreservación extremadamente rápido, en el cual los embriones son incluidos en soluciones altamente concentradas de crioprotectores y sumergidos directamente en el nitrógeno líquido, desde una temperatura superior a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se requieren sólo unos segundos para congelarse (Kasai, 1997). Así se logra la solidificación de la solución crioprotectora al tomar contacto con el nitrógeno líquido, producto del aumento extremo de su viscosidad, que no involucra la formación de cristales de hielo (Fahy *et al.*, 1984).

Para aumentar la eficiencia de vitrificación y la tasa de sobrevivencia de los embriones criopreservados, se desarrolló la blastoclectomía, una técnica de micromanipulación aplicada a blastocistos y se reduce artificialmente el volumen del blastocoele con micromanipuladores, una microaguja, una micropipeta de sujeción y un microscopio invertido (Motoishi, 2000). Este procedimiento mejora la tasa de sobrevivencia y la tasa de gestación de embriones humanos vitrificados (Mukaida *et al.*, 2006).

Alrededor del día 7 el embrión bovino se conoce como blastocisto, el cual tiene una cavidad central llena de fluido llamada blastocoele, donde los expandidos tienen mayor cantidad de líquido *versus* los tempranos. Sin embargo, a medida que el desarrollo continúa se da lugar a un blastocisto expandido, el

## INTRODUCTION

Embryo cryopreservation is a method for the commercial transfer of embryos. The number of embryos cryopreserved and their survival time are increasing, which almost equals the survival rate of fresh embryos (Shaw *et al.*, 2000). Cryopreservation by slow curves is a slow procedure that exposes the embryo, in different stages of freezing, to the action of physical, chemical and biological factors, with rates of temperature decrease of  $0.5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  up to  $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$  to then submerge them in nitrogen and keep them there indefinitely; the drawback is that expensive and sophisticated equipment is required (Lopatárova *et al.*, 2002).

Vitrification is an extremely rapid method of cryopreservation, in which embryos are included in highly concentrated solutions of cryoprotectants and submerged directly in the liquid nitrogen, from a temperature higher than  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  and thus require only a few seconds to freeze (Kasai, 1997). In this way the solidification of the cryoprotective solution is achieved by contact with liquid nitrogen, product of the extreme increase in its viscosity, which does not involve the formation of ice crystals (Fahy *et al.*, 1984).

To increase the efficiency of vitrification and the survival rate of cryopreserved embryos, blastoclectomy was developed, which is a micromanipulation technique applied to blastocysts, which consists of artificially reducing blastocoele volume with micromanipulators, a microneedle, a holding micropipette and an inverted microscope (Motoishi, 2000). This procedure improves the survival rate and the gestation rate of vitrified human embryos (Mukaida *et al.*, 2006).

Around day 7, the bovine embryo is known as a blastocyst, which has a central cavity filled with fluid called blastocoele, where the expanded ones have a greater amount of fluid *versus* the early ones. However, as the development continues, an expanded blastocyst develops, which is characterized by an increase in size due mainly to the increase in the amount of fluid in the blastocoele causing the internal cell mass to become compact and the trophoblast cells stick to the pellucid zone which is thinned (Mapletoft *et al.*, 2002).

A problem is when the blastocysts exposed to vitrification are expanded, since survival rates of about 35 % are obtained (Cho *et al.*, 2002). In

cual se caracteriza por un aumento en el tamaño debido principalmente al incremento en la cantidad de líquido en el blastocele haciendo que la masa celular interna se haga compacta y las células del trofoblasto se peguen a la zona pelúcida la cual se ve adelgazada (Mapletoft *et al.*, 2002).

Un problema es cuando los blastocistos expuestos a la vitrificación están expandidos, ya que las tasas de sobrevivencia son alrededor de 35 % (Cho *et al.*, 2002). En embriones humanos a pesar de las altas tasas de implantación y embarazo luego de transferencias de blastocistos en fresco, la tasa de sobrevivencia disminuye luego de su criopreservación y descongelamiento, reduciendo las posibilidades de gestación (Vanderzwalmen *et al.*, 2002).

En el blastocele de los blastocistos expandidos se pueden formar cristales de hielo durante el congelamiento. Una inadecuada penetración de los crioprotectores o una velocidad de la curva de congelación menor a  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  que desciende de  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ , promueve esta formación de hielo, dañando los embriones (Kaufmann *et al.*, 1995). El blastocele de un blastocisto expandido se colapsó con una pipeta de cristal con diámetro más pequeño al del blastocisto antes de ser vitrificado lo que dio como resultado una tasa de 91 % de sobrevivencia, 65 % en la tasa de embarazo y 61 % en la tasa de implantación (Motoishi, 2000). Según Son *et al.* (2003), la tasa de sobrevivencia de blastocistos aumentó 19.4 % cuando el volumen del blastocele se redujo artificialmente con una aguja.

La hipótesis de este estudio fue que el método de criopreservación por vitrificación *versus* curva lenta alcanza una tasa mayor de eclosión *in vitro* de blastocistos bovinos con o sin blastoclectomía. El objetivo fue determinar la tasa de eclosión *in vitro* para blastocistos bovinos criopreservados por vitrificación *versus* curva lenta y con o sin blastoclectomía.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del laboratorio *in vitro*

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Fertilización *in vitro* de la Posta Zootécnica "Torreón del Molino" adscrito a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana ( $19^{\circ} 10' \text{N}$ ,  $96^{\circ} 10' \text{O}$  y altitud de 15 msnm) (Mijares *et al.*, 1988).

human embryos despite the high rates of implantation and pregnancy after transfers of fresh blastocysts, the survival rate decreases after cryopreservation and thawing, reducing the chances of gestation (Vanderzwalmen *et al.*, 2002).

In the blastocoel of the expanded blastocyst ice crystals can be formed during freezing. An inadequate penetration of the cryoprotectants or a speed of the freezing curve of less than  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  that descends from  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ , promotes this icing, damaging the embryos (Kaufmann *et al.*, 1995). The blastocoel of an expanded blastocyst was collapsed with a glass pipette with smaller diameter than the blastocyst before being vitrified resulting in a 91 % survival rate, 65 % in the pregnancy rate and 61 % in the rate of implantation (Motoishi, 2000). According to Son *et al.* (2003), the survival rate of blastocysts increased 19.4 % when the blastocoel volume was artificially reduced with a needle.

The hypothesis of this study was that the method of cryopreservation by vitrification *versus* slow curve achieves a higher *in vitro* hatching rate of bovine blastocysts with or without blastocoelectomy. The objective was to determine the *in vitro* hatching rate for bovine blastocysts cryopreserved by vitrification *versus* slow curves and with or without blastocoelectomy.

## MATERIALS AND METHODS

### Location of the *in vitro* laboratory

This study was carried out in the *in vitro* Fertilization Laboratory of the "Torreón del Molino" Zootechnical Post attached to the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the Universidad Veracruzana ( $19^{\circ} 10' \text{N}$ ,  $96^{\circ} 10' \text{W}$  and altitude of 15m ASL) (Mijares *et al.*, 1988).

### Blastocysts

For this study, 60 bovine embryos produced *in vivo* of the Holstein breed were used, which were classified according to their quality and stage of development, as established by the International Society of Embryo Transfer (Lindner and Wright, 1983). The blastocysts were randomly assigned to four groups: 30 were cryopreserved by slow curve (CL) using ethylene glycol (Sigma) as cryoprotectant, and only 15 were blastocentesis (Blx+CL); 30 were vitrified (VT), and 15 had blastocentesis (Blx+VT). The embryos were stored at  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  in liquid nitrogen ( $\text{N}_2\text{L}$ ) until their use.

## Blastocistos

Para este estudio se utilizaron 60 embriones bovinos producidos *in vivo* de la raza Holstein, que se clasificaron de acuerdo con su calidad y estadio de desarrollo, según lo establece la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (Lindner y Wright, 1983). Los blastocistos se asignaron de manera aleatoria a cuatro grupos: 30 se criopreservaron por curva lenta (CL) usando etilenglicol (Sigma) como crioprotector, y sólo a 15 se practicó la blastocentesis (Blx+CL); 30 se vitrificaron (VT), y 15 contaron con blastocentesis (Blx+VT). Los embriones se almacenaron a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido ( $\text{N}_2\text{L}$ ) hasta su utilización.

### Criopreservación de los blastocistos

#### Curva lenta

La preparación de los embriones antes de la congelación consistió en colocarlos en una caja de Petri de  $35\times 10\text{ mm}$  (Nunc™, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA) con medio de congelación 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 ( $20\text{--}22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 10 a 30 min (Wright, 1985). Luego los embriones se depositaron en pajillas de 0.25 ml con tapa (hasta 3 blastocistos por pajilla), se rotularon y se introdujeron en la congeladora *Freeze Control*, modelo CL 5500 (Cryologic®, Australia) cargada con  $\text{N}_2\text{L}$ , se esperó 2 min a que se estabilizaran y se indujo la cristalización con una pinza de metal enfriada en  $\text{N}_2\text{L}$  a cada una de las pajillas. Una vez lograda la cristalización la congeladora se programó en la función 0, correspondiente para la congelación de embriones de bovino. El programa inició con  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ , después de 10 min comienza a bajar a razón de  $0.5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta llegar a  $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ , momento en el cual los embriones se almacenaron directamente en  $\text{N}_2\text{L}$  (Arreseigor *et al.*, 1998).

#### Vitrificación

Para vitrificar los embriones se utilizó solución de equilibrio (ES), compuesta PBS (*In Vitro Care*®) al 20 % de sustituto sintético de suero (SSS, Irvine Scientific) más 7.5 % de EG (Sigma) y 7.5 % de dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma) y solución de vitrificación (VS), compuesta de PBS (*In Vitro Care*®) al 20 % de SSS (Irvine Scientific) más 15 % de EG (Sigma), 15 % de DMSO (Sigma) y 0.5 M de sucrosa (Sigma). En una caja de Petri se colocaron una gota de ES y cuatro gotas de VS de  $20\text{ }\mu\text{L}$  cada una, después se introdujeron los embriones en la gota de ES por 5 a 15 min, se pasaron a las cuatro gotas de VS y se

## Cryopreservation of blastocysts

#### Slow curve

Preparation of the embryos before freezing consisted of placing them in a  $35\times 10\text{ mm}$  Petri dish (Nunc™, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) with freezing medium phosphate buffered solution (PBS; Fisher BioReagents™, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) plus 1.5 M ethylene glycol (EG, Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germany) at room temperature ( $20\text{--}22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) for 10 to 30 min (Wright, 1985). Then embryos were deposited in  $0.25\text{ mL}$  straws with lid (up to 3 blastocysts per straw) were labeled and placed in the freezer *Freeze Control*, Model CL 5500 (Cryologic®, Australia) loaded with  $\text{N}_2\text{L}$ , and after 2 min to allow stabilization, crystallization was induced with a metal clamp cooled in  $\text{N}_2\text{L}$  to each of the straws. Once the crystallization was achieved, the freezer was programmed in function 0, corresponding to the freezing of bovine embryos. The program started with  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ , after 10 min it starts to fall at a rate of  $0.5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  until it reaches  $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ , at which time embryos were stored directly in  $\text{N}_2\text{L}$  (Arreseigor *et al.*, 1998).

#### Vitrification

To vitrify the embryos, an equilibrium solution (ES) was used, composed of PBS (*In Vitro Care*®) with 20 % synthetic serum substitute (SSS, Irvine Scientific) plus 7.5% EG (Sigma) and 7.5% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma) and vitrification solution (VS), composed of PBS (*In Vitro Care*®) at 20 % SSS (Irvine Scientific) plus 15 % EG (Sigma), 15 % DMSO (Sigma) and 0.5 M sucrose (Sigma). One drop of ES and four VS drops of  $20\text{ }\mu\text{L}$  each were placed in a Petri dish, the embryos were then introduced into the ES drop for 5 to 15min and then transferred to the four VS drops. and they were maintained 5, 5, 10 and 10s in each drop, respectively and in less than 30s were placed in the *Criotop*® and submerged in  $\text{N}_2\text{L}$ ; the lid was placed and stored until its later heating (Kuwayama *et al.*, 2005).

#### Blastocoelectomy

For this, an inverted microscope (Nikon®) and a micro-manipulator equipped with a holding or holding pipette (Humagen™) with a blunt distal end, external diameter of  $60\text{ }\mu\text{m}$ , internal of  $20\text{ }\mu\text{m}$  and an angle of  $30^{\circ}$  were used. with a PZD (*Partial Zone Dissection*; Swemed™) microneedle with a diameter of  $11\text{ }\mu\text{m}$ , a length of  $60\text{ mm}$  and an angle of  $30^{\circ}$ .

The blastocysts were placed in a drop of  $20\text{ }\mu\text{L}$  of PBS (*In Vitro Care*®) covered with mineral oil to perform the Blx; with the inverted microscope and the micromanipulators the blastocyst was

mantuvieron 5, 5, 10 y 10 s en cada gota, respectivamente y en menos de 30 s se colocaron en el Criotop<sup>®</sup> y se sumergieron en N<sub>2</sub>L; se colocó la tapa y se almacenó hasta su calentamiento (Kuwayama *et al.*, 2005).

### Blastoceleotomía

Para esto se utilizó un microscopio invertido (Nikon<sup>®</sup>) y un micromanipulador equipado con una pipeta de sujeción o *holding* (Humagen<sup>™</sup>) con extremo distal romo, diámetro externo de 60  $\mu$ m e interno de 20  $\mu$ m y un ángulo de 30° y con una microaguja PZD (*Partial Zona Dissection*; Swemed<sup>™</sup>) con diámetro de 11  $\mu$ m, longitud de 60 mm y un ángulo de 30°.

Los blastocistos se colocaron en una gota de 20  $\mu$ L de PBS (*In Vitro Care*<sup>®</sup>) cubierta con aceite mineral para realizar la Blx; con el microscopio invertido y los micromanipuladores se inmovilizó el blastocisto con la micropipeta de sujeción con la masa celular interna (MCI) dirigida a las 12 o 6, según las manecillas del reloj (Figura 1) para evitar daños, se perforó con la microaguja la zona pelúcida y se esperaron 2 min o hasta que saliera la máxima cantidad de líquido del blastocoele (Hiraoka *et al.*, 2004).

### Descongelamiento de blastocistos

#### Descongelación

La descongelación de los blastocistos criopreservados por CL se realizó sacando la pajilla del N<sub>2</sub>L manteniéndolas por 10 seg a temperatura ambiente, y sumergiéndola en agua a 37 °C durante 45 s. Después se secó y cortó un extremo de la pajilla para después colocar los blastocistos en medio IVC3<sup>™</sup> (*In Vitro Care*<sup>®</sup>; libre de fosfato y niveles elevados de glucosa, más aminoácidos, vitaminas y glutatión) para su cultivo (Voelkel y Hu, 1992).

#### Calentamiento de blastocistos

Dado que la vitrificación es un proceso físico diferente al de la congelación, es necesario definir el significado de la terminología usada en el tema. Respecto a 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 esto se utilizaron la solución de calentamiento (TS), compuesto de PBS (*In Vitro Care*<sup>®</sup>) con SSS (Irvine Scientific) al 20 % más 1 M sucrosa (Sigma); la solución de dilución (DS), compuesta de PBS (*In Vitro Care*<sup>®</sup>) con SSS (Irvine Scientific) al 20 % más 0.5 M sucrosa (Sigma) y la solución de lavado (WS),

immobilized with the micropipette holding the internal cell mass (MCI) directed at 12 or 6, according to the clock hands (Figure 1) to avoid damage, the microneedle was perforated with the pellucid zone and 2 min were waited until the maximum blastocoele liquid quantity was released (Hiraoka *et al.*, 2004).

### Thawing blastocysts

#### Thawing

The thawing of the blastocysts cryopreserved by CL was done by removing the straw from N<sub>2</sub>L keeping them for 10 s at room temperature, and submerging it in water at 37 °C for 45 s. Then, one end of the straw was dried and cut and then the blastocysts were placed in IVC3<sup>™</sup> medium (*In Vitro Care*<sup>®</sup>, free of phosphate and high levels of glucose, plus amino acids, vitamins and glutathione) for its culture (Voelkel and Hu, 1992).

#### Heating of blastocysts

Because vitrification is a physical process different from that of freezing, it is necessary to define the meaning of the terminology used in the subject. Regarding carrying the vitrified biological material back to the laboratory ambient temperature, the term “heat” and not “thawing” is used (Palma and Brem, 2008).

For this, the heating solution (TS), composed of PBS (*In Vitro Care*<sup>®</sup>) with SSS (Irvine Scientific) at 20 % plus 1 M sucrose (Sigma); the dilution solution (DS), composed of PBS (*In Vitro Care*<sup>®</sup>) with SSS (Irvine Scientific) at 20 % plus 0.5 M sucrose (Sigma) and wash solution (WS), composed of PBS (*In Vitro Care*<sup>®</sup>) with SSS (Irvine Scientific) at 20 %. A drop



**Figura 1. Posición correcta de la masa celular interna (MCI) para realizar la blastoceleotomía.**

**Figure 1. Right position of the internal cell mass (MCI) to perform blastocoelectomy**

compuesta de PBS (*In Vitro Care*<sup>®</sup>) con SSS (Irvine Scientific) al 20 %. Una gota de 300  $\mu\text{L}$  se colocó en una caja de Petri a 37 °C y en otra caja se colocaron dos gotas de DS y tres gotas de WS de 20  $\mu\text{L}$  cada una a temperatura ambiente. El calentamiento de los blastocistos se realizó destapando el Cryotop<sup>®</sup>, sacándolo del N<sub>2</sub>L y sumergiéndolo de inmediato en TS por 1 min. Después los blastocistos se colocaron en la DS por 3 min y se expusieron a la WS por 3 min en cada gota (Kuwayama *et al.*, 2005). Luego se colocaron en el medio IVC3<sup>™</sup> para su cultivo.

### Cultivo y desarrollo *in vitro* de blastocistos

Después de la descongelación y calentamiento, los blastocistos se colocaron en medio IVC3<sup>™</sup> (*In Vitro Care*<sup>®</sup>) más un suplemento con 10 % SSS y se cultivaron 96 h en una incubadora a 38.5 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, 5 % de aire y 95 % de humedad (Edwards *et al.*, 1997), evaluando cada 24 h el estadio de desarrollo de los blastocistos.

### Análisis estadístico

La variable de respuesta fue la tasa de eclosión (TE) por tratamiento de los embriones cultivados, la cual se analizó mediante la prueba  $\chi^2$  para determinar el grado de asociación o dependencia entre las proporciones. El efecto de los tratamientos sobre TE se evaluó mediante el procedimiento de Cochran y Mantel-Haenszel ( $p \leq 0.05$ ). Este procedimiento se realizó con SPSS ver. 17.0. El diseño fue completamente al azar con arreglo factorial 2 $\times$ 2, con tamaño de muestra de 60 embriones, con 15 repeticiones para el primer factor (método de criopreservación) y 15 repeticiones para el segundo factor (Blx o no).

### Modelo estadístico

El modelo estadístico lineal fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + C_i + B_j + CB_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

donde  $\mu$  es la media general;  $C_i$  es el  $i$ -ésimo efecto de criopreservación;  $B_j$  es el  $j$ -ésimo efecto de blastolectomía;  $CB_{ij}$  es el doble interacción de los factores;  $\varepsilon_{ij}$  es el error experimental.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Curva lenta *vs.* vitrificación

La tasa general de eclosión de blastocistos fue 43.3 %. La vitrificación tuvo tasa de eclosión *in vitro*

of 300  $\mu\text{L}$  was placed in a Petri dish at 37 °C and in another box were placed two drops of DS and three drops of WS of 20  $\mu\text{L}$  each at room temperature. Heating of the blastocysts was performed by uncovering the Cryotop<sup>®</sup>, removing it from the N<sub>2</sub>L and immersing it immediately in TS for 1 min. Then the blastocysts were placed in the DS for 3 min and then exposed to the WS for 3 min in each drop (Kuwayama *et al.*, 2005). They were then placed in the IVC3<sup>™</sup> medium for their cultivation.

### Cultivation and *in vitro* development of blastocysts

After thawing and warming, the blastocysts were placed in IVC3<sup>™</sup> medium (*In Vitro Care*<sup>®</sup>) plus an additional 10 % SSS and cultured 96 h in a 38.5 °C incubator, 5 % CO<sub>2</sub>, 5 % of air and 95 % humidity (Edwards *et al.*, 1997), evaluating the stage of development of the blastocysts every 24 h.

### Statistical analysis

The response variable was the hatching rate (TE) for treatment of the cultured embryos, which was analyzed by the  $\chi^2$  test to determine the degree of association or dependence between the proportions. The effect of treatments on TE was evaluated using the Cochran and Mantel-Haenszel procedure ( $p \leq 0.05$ ). This procedure was performed with SPSS ver. 17.0. The experimental design was completely randomized with factorial arrangement 2 $\times$ 2, with a sample size of 60 embryos, with 15 repetitions for the first factor (cryopreservation method) and 15 repetitions for the second factor (Blx or not).

### Statistical model

The linear statistical model was the following:

$$Y_{ij} = \mu + C_i + B_j + CB_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

where  $\mu$  is the general mean value;  $C_i$  is the  $i$ -th cryopreservation effect;  $B_j$  is the  $j$ -th blastolectomy effect;  $CB_{ij}$  is the double factors interaction;  $\varepsilon_{ij}$  is the experimental error.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Slow curve *vs.* vitrification

The overall blastocyst hatching rate was 43.3%. The vitrification had higher *in vitro* hatching rate than the cryopreserved embryos (Table 1). This was due to decreasing the damages caused by the intracellular formation of ice, passing quickly

mayor que los embriones criopreservados (Cuadro 1). Esto se debió al disminuir los daños causados por la formación intracelular de hielo, pasando rápido por el margen de temperatura que resulta desestabilizador, como lo reportaron Kaufmann *et al.* (1995). En la etapa de la desvitrificación se incorporan carbohidratos, y también se hace con diferentes concentraciones hasta restablecer la habitual para ellos (Martino *et al.*, 1996), de tal manera que el análisis de la razón de ventajas indica que los embriones criopreservados por VT tuvieron 26 oportunidades más de eclosionar, comparados con los criopreservados por CL. Esto concuerda con lo reportado por Nedambale *et al.* (2004), quienes compararon el desarrollo de embriones bovinos producto de fertilización *in vitro* criopreservados por CL y VT, y en la tasa de desarrollo *in vitro* a las 24 h post-descongelación hubo diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) para los embriones vitrificados respecto a los congelados por curva lenta (64 vs. 40 %). Stehlik *et al.* (2005) reportaron que la tasa de sobrevivencia de blastocistos humanos fue significativamente más alta al usar vitrificación respecto a curva lenta (100 y 83 %). Los resultados de nuestro estudio son similares a los de Yu *et al.* (2010) y Kader *et al.* (2010), quienes reportan tasa de sobrevivencia post-descongelación mayor a las 24 y 72 h en los embriones vitrificados contra los congelados por curva lenta. Lo anterior coincide con nuestro estudio ya que se obtuvo una

through the temperature margin that is destabilizing, as reported by Kaufmann *et al.* (1995). In the devitrification stage carbohydrates are incorporated, and it is also done with different concentrations until it is restored the usual one for them (Martino *et al.*, 1996), in such a way that the analysis of the advantage ratio indicates that the embryos cryopreserved by VT they had 26 more opportunities to hatch compared to those cryopreserved by CL. This agrees with that reported by Nedambale *et al.* (2004), who compared the development of bovine embryos product of *in vitro* fertilization cryopreserved by CL and VT, and in the rate of development *in vitro* at 24 h post-thawing there was statistical difference ( $p \leq 0.05$ ) for vitrified embryos that for frozen by slow curve (64 vs. 40 %). Stehlik *et al.* (2005) reported that the rate of survival of human blastocysts was significantly higher when using vitrification with respect to slow curves (100 and 83 %). The results of our study are similar to those of Yu *et al.* (2010) and Kader *et al.* (2010), who report post-thawing survival rate higher than 24 and 72 h in vitrified embryos *versus* frozen by slow curve. This coincides with what was found in our study since a higher survival rate was obtained in the vitrified blastocysts ( $p \leq 0.05$ ).

The cryopreservation method affects not only the post-thawing survival rate but also the *in vitro*

**Cuadro 1. Efecto del método de criopreservación y blastoclectomía (Blx) sobre la tasa de eclosión *in vitro* post-descongelación de embriones bovinos.**  
**Table 1. Effects of cryopreservation and blastoclectomy (Blx) methods on post-thawing *in vitro* hatching rate of bovine embryos.**

| Tratamiento         | Eclosión (72 h) (%)        | $\chi^2$ (p)                                    | $\chi^2$ Cochran y M-H. (p) |
|---------------------|----------------------------|---|-----------------------------|
| Curva lenta (CL)    | 2/15 (13.3) <sup>a</sup>   | (p=0.05) OR=26; IC <sub>95</sub> % (3.7-183)    | (p>0.05)                    |
| Vitrificación (VT)  | 12/15 (80) <sup>b</sup>    |   |                             |
| CL+Blx              | 8/15 (53.3) <sup>b,c</sup> | (p=0.14) OR=0.32; IC <sub>95</sub> % (0.07-1.5) | (p>0.05)                    |
| VT+Blx              | 4/15 (26.7) <sup>a,c</sup> |   |                             |
| Efectos principales |                            |   |                             |
| Curva lenta (CL)    | 2/15 (13.3) <sup>a</sup>   | (p=0.02) OR=7.4; IC <sub>95</sub> % (1.2-45)    | (p>0.05)                    |
| CL+Blx              | 8/15 (53.3) <sup>b,c</sup> |   |                             |
| Vitrificación (VT)  | 12/15 (80) <sup>b</sup>    | (p=0.003) OR=0.09; IC <sub>95</sub> % (0.2-0.5) | (p>0.05)                    |
| VT+Blx              | 4/15 (26.7) <sup>a,c</sup> |   |                             |

<sup>a,b</sup> Superíndices diferentes denotan diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ). <sup>a,b</sup> Different superscripts indicate statistical difference ( $p \leq 0.05$ ).

mayor tasa de sobrevivencia en los blastocistos vitrificados ( $p \leq 0.05$ ).

El método de criopreservación afecta a la tasa de sobrevivencia post-descongelación y también la tasa de desarrollo embrionario *in vitro*. Una forma de medir esta variable es por el porcentaje de blastocistos que eclosionan de la zona pelúcida (Nicacio *et al.*, 2011).

Nedambale *et al.* (2004) reportaron una tasa de eclosión de 60 y 31 % para embriones criopreservados por vitrificación y curva lenta, respectivamente. Mucci *et al.* (2006) realizaron un estudio en blastocistos bovinos fertilizados *in vitro*, y obtuvieron mayor tasa de eclosión en embriones vitrificados (43 %) que en los de curva lenta (12 %). En nuestro estudio los resultados fueron similares a los recién mencionados, pero opuestos a los de Nicacio *et al.* (2011), quienes reportaron una mayor tasa de eclosión en embriones criopreservados por curva lenta *versus* vitrificación (49 y 9 %, respectivamente). Es probable que estos resultados se opongan debido a diferencias en los protocolos de criopreservación, porque el descenso de la temperatura del método de curva lenta lo realizaron a una velocidad de  $1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  y la velocidad en nuestro estudio fue  $0.5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ , lo cual pudo afectar el desarrollo *in vitro* post-descongelado.

### Blastocelecomía

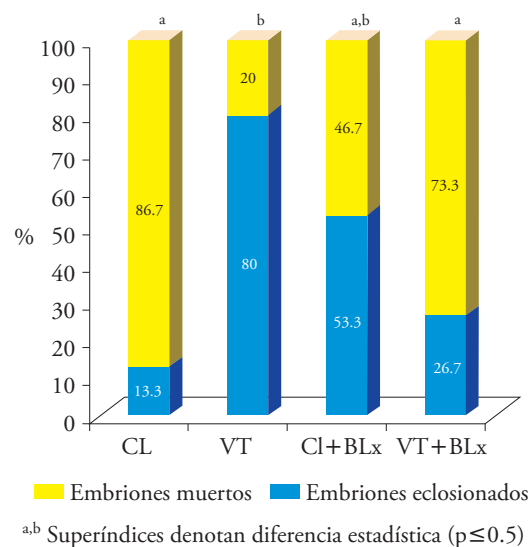
La variable de CL+Blx (53.3 %) no mostró diferencia ( $p > 0.05$ ) respecto a VT+Blx (26.7 %). Además, la tasa de eclosión (Figura 2) fue menor (13.3 %) respecto a la presentada por los embriones cuando, aparte de la CL, se hace Blx (53.3 %) y la diferencia es significativa ( $p \leq 0.05$ ). Así, el análisis de la razón de ventajas evidencia que los embriones criopreservados por CL con Blx tiene 7.4 veces mayor oportunidad de eclosionar en comparación con aquellos en los que no se hace Blx. Estos resultados concuerdan con Vanderzwalm *et al.* (2002), quienes compararon el efecto de la reducción artificial del blastocele de embriones vitrificados producidos *in vitro* en estadio de blastocisto y blastocisto expandido y no encontraron diferencias significativas en la tasa de sobrevivencia y de embriones eclosionados con y sin blastocelecomía post-calentamiento. Además, Papayannis *et al.* (2007) e Iwayama *et al.* (2011) no observaron diferencias en tasa de sobrevivencia de embriones vitrificados previa blastocelecomía. En

embryonic development rate. One way to measure this variable is by the percentage of blastocysts that manage to hatch from the pellucid zone (Nicacio *et al.*, 2011).

Nedambale *et al.* (2004) reported a hatching rate of 60 and 31 % for embryos cryopreserved by vitrification and slow curves, respectively. Mucci *et al.* (2006) carried out a study in bovine blastocysts fertilized *in vitro*, and obtained a higher hatching rate in vitrified embryos (43 %) than in those with slow curves (12%). In our study, the results were similar to those just mentioned, but were opposite to those of Nicacio *et al.* (2011), who reported a higher hatching rate in embryos cryopreserved by slow curve *versus* vitrification (49 and 9 %, respectively). It is probable that these results are opposed due to differences in the cryopreservation protocols, because the decrease of the temperature of the slow curve method was performed by them at a speed of  $1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  and the speed in our study was  $0.5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ , which could affect post-thawed *in vitro* development.

### Blastocelecomía

The variable of CL+Blx (53.3 %) showed no difference ( $p > 0.05$ ) with respect to VT+Blx



**Figura 2. Porcentaje de embriones muertos y eclosionados, criopreservados por curva lenta (CL) y vitrificación (VT) sin y con blastocelecomía (Blx) cultivados durante 72 h post-descongelación y calentamiento.**

**Figure 2. Percentage of dead and hatched cryopreserved embryos by slow curve (CL) and vitrification (VT) with and without blastocelecomía (Blx), grew during 72h post-thawing and —heating.**



contraste a lo anterior, Chen *et al.* (2005) y Mukaida *et al.* (2006) señalaron que la reducción artificial del blastocele eleva la tasa de sobrevivencia y eclosión de los embriones criopreservados.

El análisis estadístico reveló la tasa de eclosión de los embriones criopreservados por VT (80 %) *versus* VT+Blx (26.7 %). Aquí, el análisis de la razón de las ventajas indica que los embriones criopreservados por VT si se les hace Blx hay un efecto negativo, con lo cual decrece la oportunidad de eclosionar (OR=0.09; IC<sub>95</sub> % 0.2-0.5). Papayannis *et al.* (2007) y Keskin-tepe *et al.* (2009) en estudios similares encontraron diferencias estadísticas significativas, y señalan que la blastoclectomía aumenta la tasa de sobrevivencia posdescongelación en embriones criopreservados por curva lenta, comparada con la de aquellos en los cuales no se realiza dicha técnica (39 *vs.* 9 %; 83 *vs.* 95 %;  $p \leq 0.05$ ), pero no hubo diferencias en los embriones vitrificados.

En el caso de la vitrificación, al hacer la blastoclectomía se perfora la zona pelúcida (ZP) y es probable que las soluciones altamente concentradas usadas para realizar esta técnica dañen algunas células al estar en contacto directo con ellas, y esto afecte negativamente el desarrollo embrionario. Así, Chen *et al.* (2005) utilizaron un porcentaje menor de concentración de crioprotectores en el momento de vitrificar a los embriones, esto se reflejó en sus resultados y obtuvieron sobrevivencia mayor y significativa en los blastocistos en los cuales se realizó la blastoclectomía (89 *vs.* 59 %).

Hay estudios que miden la integridad del DNA de los embriones criopreservados, para lo cual se debe realizar una biopsia al embrión, esto ocasiona la salida del blastocele y se ha tomado esta técnica como una manera indirecta de hacer blastoclectomía (Desai *et al.*, 2008). Kader *et al.* (2010) compararon la tasa de sobrevivencia de blastocistos criopreservados por curva lenta y vitrificación con y sin reducción del blastocele mediante la biopsia; al igual que en nuestro experimento, estos autores reportaron diferencias significativas en blastocistos criopreservados por VT *versus* CL (91.76 *vs.* 78.76 %), pero no encontraron diferencias en los embriones criopreservados por curva lenta con reducción del blastocele *vs.* los intactos o *vs.* los embriones que se vitrificaron previa reducción de blastocele. Sin embargo, ellos reportaron mejor sobrevivencia en embriones vitrificados con reducción del blastocele que sin dicha reducción (contrario a nuestro

(26.7 %). In addition, the hatching rate (Figure 2) was lower (13.3 %) than that presented by the embryos when, apart from CL, Blx is made (53.3 %) and the difference is significant ( $p \leq 0.05$ ). Thus, the analysis of the advantage ratio shows that embryos cryopreserved by CL with Blx have 7.4 times greater opportunity to hatch compared to those in which Blx is not made. These results agree with Vanderzwalmen *et al.* (2002), who compared the effect of the artificial reduction of the blastocoel of vitrified embryos produced *in vitro* in the blastocyst and expanded blastocyst stage and did not find significant differences in the survival rate and of embryos hatched with and without post-heating blastocoelectomy. In addition, Papayannis *et al.* (2007) and Iwayama *et al.* (2011) did not observe differences in the survival rate of vitrified embryos after blastocoelectomy. In contrast to the above, Chen *et al.* (2005) and Mukaida *et al.* (2006) noted that the artificial reduction of the blastocoel increases the survival and hatching rate of cryopreserved embryos.

The statistical analysis revealed the hatching rate of embryos cryopreserved by VT (80 %) *versus* VT+Blx (26.7%). Here, the analysis of the ratio of the advantages indicates that embryos cryopreserved by VT if they are made Blx there is a negative effect, which decreases the opportunity to hatch (OR=0.09, IC<sub>95</sub> % 0.2-0.5). Papayannis *et al.* (2007) and Keskin-tepe *et al.* (2009), in similar studies, found significant statistical differences, and point out that blastocoelectomy increases the rate of post-thawing survival in embryos cryopreserved by slow curves, compared with those in which this technique is not performed (39 *vs.* 9 %; 83 *vs.* 95 %,  $p \leq 0.05$ ), but there were no differences in the vitrified embryos.

In vitrification, when blastocoelectomy is performed, the zona pellucid (ZP) is perforated and it is likely that the highly concentrated solutions used to perform this technique will damage some cells by being in direct contact with them, and this will adversely affect embryonic development. Thus, Chen *et al.* (2005) used a lower percentage of cryoprotectant concentration at the time of vitrifying the embryos, this was reflected in their results and they obtained greater and significant survival in the blastocysts in which the blastocoelectomy was performed (89 *vs.* 59 %).

There are studies that measure the DNA integrity of cryopreserved embryos, for which an embryo biopsy

estudio), por lo cual concluyeron que el método de curva lenta y la vitrificación son opciones similares para la preservación de blastocistos biopsiados y estos toleran mejor la vitrificación que los blastocistos expandidos intactos.

## CONCLUSIONES

La vitrificación de embriones bovinos es mejor que la curva lenta porque asegura un mayor porcentaje de desarrollo embrionario, reflejado en la tasa de eclosión. La blastolectomía en la vitrificación disminuye la tasa de eclosión. En cuanto al método de curva lenta no afecta realizar la blastolectomía o no.

## LITERATURA CITADA

- Arreseigor, C. J., A. Sisul, A. E. Arreseigor, and R. C. Stahring. 1998. Effect of cryoprotectant, thawing method, embryo grade and breed on pregnancy rates of cryopreserved bovine embryos *Theriogenology* 49: 160-161.
- Chen S. U., T. H. Lee, Y. R. Lien, Y. Y. Tsai, L. J. Chang, and Y. S. Yang. 2005. Microsuction of blastocoelic fluid before vitrification increased survival and pregnancy of mouse expanded blastocysts, but pretreatment with the cytoskeletal stabilizer did not increase blastocyst survival. *Fertil. Steril.* 84: 1157-1172.
- 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.
- Desai, N., J. Szeptycki, M. Scott, F. F. AbdelHafez, and J. Goldfarb. 2008. Artificial collapse of blastocysts before vitrification: mechanical *vs.* laser technique and effect on survival, cell number and cell death in early and expanded blastocysts. *Cell Preserv. Technol.* 6: 181-190.
- Edwards, J. L., A. D. Ealy, V. H. Monterroso, and P. J. Hansen. 1997. Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. *Mol. Rep. Dev.* 48: 25-33.
- Fahy, G. M., D. R. MacFarlane, C. A. Angell, and H. T. Meryman. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21: 407-426.
- 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.
- Iwayama, H., S. Hochi, and M. Yamashita. 2011. *In vitro* and *in vivo* viability of human blastocysts collapsed by laser pulse or osmotic shock prior to vitrification. *J. Assisted Reprod. Genetic* 28: 355-361.
- Kader, A., R. K. Sharma, T. Falcone, and A. Agarwal. 2010. Mouse blastocyst previtrification interventions and DNA integrity. *Fertil. Steril.* 93: 1518-1525.
- Kasai, M. 1997. Vitrification: Refined strategy for the cryopreservation of mammalian embryos. *J. Mamm. Ova Res.* 14: 17-28.
- must be performed, this results in blastocoele output and this technique has been taken as an indirect way of performing blastocoelectomy (Desai *et al.*, 2008 ). Kader *et al.* (2010) compared the survival rate of cryopreserved blastocysts by slow curve and vitrification with and without blastocoele reduction by biopsy; as in our experiment, these authors reported significant differences in blastocysts cryopreserved by VT *versus* CL (91.76 *vs.* 78.76 %), but found no difference in embryos cryopreserved by slow curve with reduction of blastocoele *vs.* the intact or *vs.* the embryos that were vitrified after reduction of blastocoele. However, they reported better survival in vitrified embryos with blastocoele reduction than without such reduction (contrary to our study), thus concluded that the slow curve method and vitrification are similar options for the preservation of biopsied blastocysts which tolerate vitrification better than intact expanded blastocysts.

## CONCLUSIONS

The vitrification of bovine embryos is better than the slow curve, because the former ensures a higher percentage of embryonic development, reflected in the hatching rate. The blastocoelectomy in vitrification decreases the hatching rate. As for the slow curve method, it does not affect neither performing blastocoelectomy or not.

—End of the English version—



- Kaufmann, R.A., Y. Menezo, A. Hazout, B. Nicollet, M DuMont, and E.J. Servy. 1995. Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 cycles. *Fertil. Steril.* 64: 1125-1129.
- Keskintepe, L., G. Sher, A. Machnicka, D. Tortoriello, A. Bayrak, J. Fisch, and Y. Agca. 2009. The use of oocyte and embryo vitrification in assisted reproductive technology. *J. Assisted Repr. Genetic* 26: 629-635.
- 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. Biomed. Online* 11: 608-614.
- Lopatárová, M., S. Cech, V. Havlíček, and L. Holý. 2002. Effect of vitrification in open pulled straws on survival of bovine embryos from superovulated cows. *Acta Vet. Brno.* 71: 93-99.
- Lindner, G. M., and R. W. Jr. Wright. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20: 407-416.

- Mapletoft, R. J., K. B. Steward, and G. P. Adams. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 42: 601-611.
- Martino, A., N. Songsasen, S., and P. Leibo. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 54: 1059-1069.
- 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. *Clin. Embryologist* 5: 6-14.
- Mucci, N., J. Allera, G. G. Kaisera, F. Hozbora, J. Cabodevila, and R. H. Alberio. 2006. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 65: 1551-1562.
- 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.
- Nedambale, T. L., A. Dinnyés, W. Groen, J. R. Dobrinsky, X. C. Tian, and X. Yang. 2004. Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 62: 437-449.
- Nicacio, A. C., R. Simões, F. F. de Paula-Lopes, F. R. de Barros, M. A. Peres, M. E. Assumpção, and J. A. Visintin. 2011. Effects of different cryopreservation methods on post-thaw culture conditions of *in vitro* produced bovine embryos. *Zygote* 20: 117-122.
- Palma, G., y G. Brem. 2008. *Biotecnología de la Reproducción*. Ed. INTA, Balcarce, Argentina. pp: 133-160.
- Papayannis, M. M, V. Eyheremendy, C. Sanjurjo, J. Blaquier, and F. G. E. Raffo. 2007. Effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor on growth, resistance to freezing and thawing and re-expansion of murine blastocysts. *Reprod. Biomed. Online* 14: 96-101.
- Shaw, J. M., A. Oranratnachai, and A. O. Trounson. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 53: 59-72.
- Son, W. Y., S. H. Yoon, H. J. Yoon, S. M. Lee, and J. H. Lim. 2003. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. *Hum. Reprod.* 18: 137-139.
- Stehlik, E., J. Stehlik, K. P. Katayama, M. Kuwayama, V. Jambor, R. Brohammer, and O. Kato. 2005. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod. Biomed. Online* 11: 53-57.
- Vanderzwalmen, P., G. Bertin, C. Debauche, V. Standaert, E. Van 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.
- Voelkel, S. A., and Y. X. Hu. 1992. Direct transfer of frozen thawed bovine embryos. *Theriogenology* 37: 23-37.
- Wright, J. 1985. Commercial freezing of bovine embryos in straws. *Theriogenology* 23: 17-29.
- Yu, X. L., W. Deng, F. J. Liu, Y. H. Li, X. X. Li, Y. L. Zhang, and L.S. Zan. 2010. Closed pulled straw vitrification of *in vitro*-produced and *in vivo*-produced bovine embryos. *Theriogenology* 73: 474-479.