



## Tasa de gestación y pérdida gestacional temprana en vacas receptoras de embriones y hemi-embriones vitrificados producidos *in vitro*



Alejandro Romero-Mercado <sup>a</sup>

Rodolfo Canseco-Sedano <sup>a</sup>

Vicente Eliezer Vega-Murillo <sup>a</sup>

Itziar Eukene Lepe-Anasagasti <sup>a</sup>

Gustavo Contreras-Hernández <sup>a</sup>

Oscar Enrique Zárate-Guevara <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Miguel Ángel de Quevedo S/N, 91710, Veracruz, Veracruz, México.

\* Autor de correspondencia: [ozarate@uv.mx](mailto:ozarate@uv.mx)

### Resumen:

El objetivo fue comparar la tasa de gestación y de pérdida gestacional temprana (60 días pos transferencia) utilizando embriones y hemi-embriones bovinos vitrificados producidos *in vitro*. Se utilizaron 60 blastocistos bovinos de calidad 1, que fueron distribuidos al azar en dos tratamientos, (1) embriones enteros vitrificados (n= 30) y (2) embriones bipartidos (hemi-embriones) vitrificados (n= 30). Los embriones enteros y hemi-embriones fueron vitrificados, almacenados, calentados y transferidos a 60 receptoras. El diagnóstico de gestación se realizó por ultrasonografía transrectal a los 30 días, y a los 60 días se determinó la pérdida gestacional. Las tasas de gestación y pérdidas gestacionales se analizaron como variables binomiales (0= no gestante; 1= gestante) y comparadas con la prueba exacta de Fisher con el programa SAS. El porcentaje de gestación y pérdida gestacional de embriones sometidos a bipartición fue similar a los embriones enteros, por lo que se puede concluir que

la bipartición en embriones *in vitro* previo a la vitrificación, no beneficia el porcentaje de gestación, ni afecta las pérdidas gestacionales en los primeros dos meses de gestación.

**Palabras clave:** Bovinos, Criopreservación, Bipartición.

Recibido: 31/05/2024

Aceptado: 11/02/2025

En la actualidad, las técnicas de aspiración folicular y fertilización *in vitro* (FIV) para producir embriones bovinos han aumentado su demanda a nivel mundial. Se estima que en la última década se han producido más embriones por FIV que por el método convencional<sup>(1)</sup>. La preferencia en su uso se debe a que mediante la FIV se puede aprovechar mejor cada dosis de semen (sexado o convencional), lo que se traduce en un mayor número de embriones por pajilla, también, es posible obtener ovocitos a partir de hembras gestantes, tiene alta repetibilidad y es una alternativa para ser aplicada en aquellas que no responden a tratamientos convencionales de ovulación múltiple<sup>(2)</sup>. Por otra parte, es importante mencionar que los resultados en cuanto a número de embriones en FIV son muy variables, ya que están altamente influenciados por la raza, edad, estatus reproductivo de la hembra, manejo de los ovocitos, condiciones ambientales y calidad del semen utilizado; aunado a esto, se han identificado hembras de alto valor genético que al ser sometidas a programas de aspiración y fertilización *in vitro* solo tienen la capacidad de producir uno o dos embriones por sesión, lo cual es una limitante para la técnica<sup>(3,4)</sup>.

Además de la baja cantidad de embriones producidos, la viabilidad de estos se ve disminuida al ser criopreservados por el método de curva lenta, debido a que presentan características desfavorables, como un menor número de blastómeros principalmente en la masa celular interna<sup>(5)</sup> y gran cantidad de gotas lipídicas dentro del citoplasma; lo anterior da como resultado un aumento en las pérdidas embrionarias<sup>(6)</sup>. Ante estas posibles problemáticas, es importante considerar la aplicación de técnicas como la bipartición embrionaria (división de un embrión en 2 mitades similares)<sup>(7)</sup> y la vitrificación de embriones (congelación ultrarrápida en estado similar al vidrio)<sup>(8)</sup>, con el fin de mejorar los porcentajes de preñez al aumentar las oportunidades de un embrión para lograr una gestación y disminuir el daño ocasionado al ser criopreservado. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de la técnica de bipartición en embriones bovinos producidos *in vitro* previo a la vitrificación sobre la tasa de gestación a los 30 y la pérdida gestacional a los 60 días post transferencia.

Los embriones se produjeron a partir de ovocitos provenientes de ovarios obtenidos en el rastro TIF 672. Los ovarios se transportaron al laboratorio en bolsas de plástico dentro de

una hielera a aproximadamente 35 °C. En el laboratorio se lavaron con solución salina fisiológica y se aspiraron todos aquellos folículos que presentaban diámetros de 2 a 8 mm. La aspiración se llevó a cabo con ayuda de una jeringa de 10 ml provista de aguja calibre 18 x 1 ½. El líquido recuperado se depositó en tubos de 50 ml para obtener el sedimento en el fondo. Dicho sedimento se transfirió a un plato de Petri el cual contenía HTF (Human tubal fluid) con tampón HEPES (*In Vitro* Care®, EUA) y albúmina, para posteriormente, con ayuda de un estereomicroscopio buscar y seleccionar los complejos cúmulo ovocito (COC) de calidad 1 (cúmulo compacto, denso, con más de tres capas y con citoplasma uniforme).

Los COC obtenidos (en promedio 140) se depositaron en una caja Petri de 35 x 10 mm con 3 ml de medio de maduración (BO-IVM). El proceso de maduración se realizó durante 24 h en una incubadora (Heraeus™, Alemania) con atmósfera humidificada con 6% de CO<sub>2</sub> en aire a 38.8 °C. Posteriormente a la maduración, los COC que presentaron una expansión del cúmulus se transfirieron en grupos de 5 a gotas de 50 µl de medio de fertilización (BO-IVF) recubiertas con aceite mineral. La fertilización *in vitro* se realizó en medio BO-IVF™ (IVF Bioscience®), según las instrucciones del fabricante. Se utilizó semen de raza Brangus rojo congelado en pajillas de 0.5 ml. Cada pajilla fue descongelada a 37 °C durante 45 seg; los espermatozoides se filtraron con ayuda de gradientes de Percoll (45%/90% [v/v]) al centrifugarse a 328 xg por 3 min. El pellet obtenido en el fondo del tubo se mezcló con 0.5 ml de medio de preparación para espermatozoides (BO- SemenPrep) y fue centrifugado a 328 xg durante 1 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet final se mezcló con 0.9 ml de medio BO-SemenPrep. Para evaluar la concentración espermática se tomaron 25 µl de los espermatozoides con el BO-SemenPrep y se mezclaron con 25 µl de agua destilada fría. En una cámara de recuento Makler™ se colocaron 10 µl de la muestra antes mencionada, para obtener una concentración final de 2 x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml.

Para el proceso de fertilización de los ovocitos, se agregaron 10 µl (20,000 espermatozoides por gota de 25 µl de medio BO-FIV) y se incubaron durante 18 h a 38.8 °C, en una atmósfera de 6 % de CO<sub>2</sub> con 100 % de humedad. Después de la fertilización, los presuntos cigotos fueron denudados con un stripper de 140 µm de diámetro (MidAtlantic) de las células del cúmulus. Posteriormente se lavaron en medio de cultivo BO-IVC™ (IVF Bioscience) para finalmente colocar cinco presuntos cigotos en gotas de 25 µl de medio BO-IVC e introducidos en la incubadora (Cook Minc™, EUA) a 38.8 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>, 6% O<sub>2</sub> y 89 % N<sub>2</sub> para desarrollarse durante los siguientes días<sup>(9)</sup>.

En los días 7 y 8 los embriones fueron evaluados y seleccionados los blastocistos calidad 1<sup>(10)</sup> para ser sometidos a bipartición. Esta técnica solo se aplicó a los embriones del tratamiento 2 (n=30). Cada embrión se colocó en una caja de Petri con medio de manipulación (PBS sin proteínas). La bipartición se realizó con una microcuchilla adaptada a un micromanipulador (M-152 Narishige, EUA) el cual se colocó en un microscopio de fondo invertido (Olympus

CK2, Japón). Al realizar el corte se pretende dividir la masa celular interna y el trofoblasto en partes iguales. El corte se lleva a cabo bajando de manera lenta la cuchilla y en un solo movimiento. Al finalizar, se administró PBS suplementado con alcohol polivinílico (PVA; Vigro, EUA) al medio sin proteínas, con la finalidad de que los hemi-embriones pudieran separarse del plato de Petri<sup>(11)</sup>.

Para llevar a cabo la vitrificación y el almacenamiento de los embriones y hemi-embriones se empleó el dispositivo Cryotop® (Kitazato, Japón)<sup>(12)</sup>. Se utilizaron dos soluciones, denominadas: solución de equilibrio (ES), compuesta por solución buffer fosfato (PBS) al 20 % de sustituto de suero sintético (SSS), 7.5 % de etilenglicol (EG) y 7.5 % de dimetilsulfóxido (DMSO), y solución de vitrificación (VS), compuesta por PBS al 20 % de SSS, 15 % de EG, 15 % DMSO y 0.5 M de sacarosa. La metodología se basó en colocar una gota de 20 µl ES y cuatro gotas de 20 µl VS en un plato de Petri, todas a temperatura ambiente; cada embrión entero o hemi-embrión se depositó en la única gota de ES durante 10-15 min; al finalizar el tiempo, se procedió a transferirlo a cada una de las gotas de VS durante 5, 5, 10 y 10 seg, respectivamente. Al finalizar, los embriones se aspiraron con una pipeta para ser colocados en el dispositivo Cryotop® (Kitazato, Japón). Por último, se sumergieron en nitrógeno líquido para su almacenamiento en un termo criogénico, hasta el día de su calentamiento<sup>(12)</sup>.

Para llevar a cabo las transferencias, se utilizaron 60 vacas de encaste *Bos taurus* / *Bos indicus* en distintas proporciones, con edades de entre 4 a 7 años, condición corporal de 2.5 a 3 (en la escala del 1 al 5), clínicamente sanas, sin historial de partos distócicos, metritis o abortos, sin anomalías en el tracto reproductivo, además de presentar un cuerpo lúteo y/o folículos de más de 10 mm en alguno de los ovarios el día de la selección, lo cual se evaluó mediante ecografía (Kaixin® modelo XK5000). Las receptoras se vacunaron un mes antes de iniciar el protocolo de sincronización (Cattle Master®4+L5, Zoetis, México), desparasitadas interna (Valbazen 10%, Zoetis, México) y externamente (Effipro® Bovis, Virbac, México), además de ser alimentadas en potreros con pasto *Brachicaria brizantha* y sal mineral a libre acceso. El protocolo para sincronización de la ovulación en las receptoras se llevó a cabo mediante la colocación de un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (CIDR-B®, 1.9 g de P<sub>4</sub>, Zoetis, México) y 2 mg de benzoato de estradiol (Bioestrogen® Biogenesis Bagó, Argentina) por vía intramuscular, el día cero del protocolo. El día 8 fueron retirados los CIDR-B®, se aplicaron 300 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) (Novormon®, Zoetis, México), 25 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Zoetis, México) y 1 mg de cipionato de estradiol (E.C.P.®, Zoetis, México) vía intramuscular<sup>(13)</sup>.

Las transferencias se realizaron nueve días después del retiro del dispositivo intravaginal. Para el calentamiento de los embriones y hemi embriones se utilizaron tres soluciones,

denominadas: solución de calentamiento (TS), compuesta por PBS con SSS al 20 % y 1 M de sacarosa; solución de dilución (DS), compuesta de PBS con SSS al 20 % y 0.5 M de sacarosa; y solución de lavado (WS), compuesta por PBS con SSS al 20 %. En primer lugar, se colocaron 500 µl de TS a 37 °C en un plato de Petri. En un segundo plato se colocaron tres gotas de 20 µl de DS y dos de WS, a temperatura ambiente. El Cryotop®, se destapó dentro de una hielera con nitrógeno líquido, y fue sumergido rápidamente en la gota de TS durante 1 min. Posteriormente, con ayuda de una pipeta Pasteur, los embriones se colocaron por 2 min en cada una de las gotas de DS; por último, se depositaron en WS por 3 min en cada gota<sup>(12)</sup>. Al finalizar el tiempo, los embriones se colocaron en PBS y se aspiraron en pajillas de 0.25 cc (individualmente los enteros, y en pares los hemi-embriones) para su transferencia de manera aleatoria a las 60 receptoras: enteros vitrificados (n= 30) y bipartidos vitrificados (n= 30), es decir, cada una de las hembras recibió un embrión completo o dos hemi-embriones, respectivamente. Las transferencias se llevaron a cabo de manera no quirúrgica-transcervical en aquellas hembras que a la palpación y ecografía rectal presentaron un cuerpo lúteo de al menos 20 mm de diámetro. Cinco minutos antes la transferencia, se aplicaron 5 ml de anestesia al 2 % vía epidural (100 mg, Lidocaína®, Intervet, México) a cada una de las receptoras, para minimizar las contracciones rectales y facilitar el manejo del aparato reproductor durante la transferencia<sup>(14)</sup>.

La pajilla de 0.25 ml previamente cargada con un embrión completo o dos hemi-embriones se introdujo en un aplicador metálico, mismo que se cubrió con una funda estéril y posteriormente con una funda plástica. El aplicador se introdujo en la vagina hasta llegar a la oz externa del cérvix, y se procedió a atravesar el canal cervical, mediante manipulación rectal, guiándolo hacia el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo, en donde se depositó el embrión o hemi-embriones. El diagnóstico de gestación se llevó cabo mediante ecografía transrectal a los 30 y 60 días posteriores a la transferencia, se evaluó la presencia de vesícula amniótica (30 días) y el latidocardiaco del producto (60 días).

Para determinar el tamaño de muestra se realizó un análisis de potencia con PROC POWER de SAS<sup>(15)</sup> para las frecuencias de los tratamientos. Las proporciones por tratamiento modeladas fueron de 0.10 y 0.40, considerando una potencia de la prueba de 0.80, y un nivel de significancia de 0.5. Debido a que se probó un tratamiento que se esperaba incrementara la tasa de gestación, se utilizó una prueba de una cola con la opción sides=1. El número de observaciones por tratamiento estimado fue de 30 animales por grupo. Se utilizó un diseño completamente al azar con dos tratamientos (sin y con bipartición) con 30 repeticiones (vaca receptora) cada uno. Para determinar la relación estadística entre la tasa de gestación a los 30 y 60 días se realizó la prueba exacta de Fisher para tablas de contingencia de muestras pequeñas, utilizando la opción Fisher de PROC FREQ de SAS (2013)<sup>(15)</sup> y el enunciado Weight para especificar las frecuencias de las observaciones.

Al evaluar y analizar los resultados de gestaciones al día 30 posterior a la transferencia (Cuadro 1), no se detectó diferencia entre los tratamientos de embriones enteros y hemiembriones vitrificados producidos *in vitro* ( $P > 0.05$ ). Trabajos previos han reportado un 30 % de receptoras gestantes cuando se realizaron de manera individual (un hemiembrión por transferencia)<sup>(14)</sup>, mientras que en el presente estudio fue superior (36 %) al transferir dos hemiembriones a la misma receptora; esta diferencia puede deberse a la transferencia de los dos hemiembriones, ya que la cantidad de células del trofoectodermo no se ven disminuidas a la mitad, como ocurre al transferir un hemiembrión individualmente; esto puede causar la disminución en la cantidad de interferón tau (producido en las células de trofoectodermo), el cual está asociado con el mantenimiento del cuerpo lúteo y la preñez temprana.

**Cuadro 1:** Frecuencias observadas para el diagnóstico de gestación a los 30 días post-transferencia de embriones enteros y bipartidos

Tratamiento	N	Gestación día 30 (%)	$P \leq F$	IC 95%
Entero	30	20.0	0.0838	0.13 - 0.96
Bipartido	30	36.6		

n = número de observaciones;  $P$  = valor de probabilidad menor al valor de  $F$ ; IC = intervalo de confianza al 95%.

De igual manera, se evidenció que la técnica de vitrificación utilizada tiene la capacidad de mantener la viabilidad de los hemiembriones producidos *in vitro*; también, la técnica de vitrificación ha sido aplicada a embriones enteros producidos *in vitro*, los cuales fueron bipartidos después del calentamiento. Se ha reportado un resultado de 46 % de gestación a los 65 días pos transferencia<sup>(16)</sup>, mientras que en el presente estudio fue inferior (33 %) a los 60 días, como se observa en el Cuadro 2. La diferencia de los porcentajes de gestación puede atribuirse a que los embriones fueron bipartidos después de ser calentados. Por otra parte, estos hemiembriones se cultivaron por 2 h después de su bipartición, lo cual pudo ayudar a su re expansión previo a la transferencia, mejorando su viabilidad y capacidad para lograr una gestación. Aunque los porcentajes de gestación fueron menores en el presente estudio, la bipartición de los embriones se llevó a cabo antes de ser vitrificados, lo cual pudo provocar una mayor exposición a los crioprotectores, ya que al ser hemiembriones, no cuentan con una zona pelúcida completa que pueda cubrirlos. La decisión de realizar la bipartición antes de la vitrificación se justifica debido a que de esta manera se elimina la necesidad de llevar a campo un microscopio invertido para realizarla posterior al calentamiento de los embriones.

**Cuadro 2:** Frecuencias observadas para el diagnóstico de gestación a los 60 días pos-transferencia de embriones enteros y bipartidos

Tratamiento	N	Gestación día 60 (%)	$P \leq F$	IC 95%
Entero	30	16.7	0.0838	0.12 - 0.96
Bipartido	30	33.3		

n= número de observaciones;  $P$ = valor de probabilidad menor a al valor de  $F$ ; IC= intervalo de confianza al 95%.

Las pérdidas gestacionales determinadas entre el día 30 y 60 pos transferencia no fueron diferentes ( $P > 0.05$ ) en ninguno de los tratamientos, evidenciando que no aumentan por efecto de la bipartición (Cuadro 3). La pérdida gestacional temprana es uno de los problemas con mayor repercusión en el resultado final de las transferencias, se estiman entre 3.1 y 14 %<sup>(17,18)</sup> al transferir embriones enteros producidos *in vitro* frescos, mientras que en embriones criopreservados se ha estimado de entre 8.9 y 41 %<sup>(17,19,20)</sup>. Los porcentajes obtenidos en este estudio se encuentran entre los reportados anteriormente, las pérdidas gestacionales obtenidas entre el día 30 y 60 pos transferencia en el grupo testigo (enteros vitrificados), fueron porcentualmente inferiores en comparación con otros autores<sup>(17,20)</sup>. Esto puede deberse al protocolo de vitrificación, medios de cultivo, receptoras y manejo, realmente no existe un solo factor que pueda determinar este resultado. Las diferencias en los porcentajes de pérdidas gestacionales encontradas en distintos estudios se atribuyen a la gran variabilidad en la expresión de genes, ya que estos pueden alterar el metabolismo de lípidos a nivel mitocondrial, lo que aumenta la cantidad de gotas lipídicas en su citoplasma, dando como resultado una disminución en la viabilidad<sup>(14,21)</sup>. Se ha demostrado que aun cuando los embriones producidos *in vitro* se consideran aparentemente de excelente calidad, puede presentarse variación en la expresión génica que causa fallas en el desarrollo del producto y en las membranas fetales, lo que provoca pérdidas gestacionales<sup>(22)</sup>, siendo éste uno de los factores que pueden afectar la obtención de porcentajes de preñez consistentes.

**Cuadro 3:** Frecuencias observadas para las pérdidas gestacionales entre los días 30 y 60 en embriones enteros y bipartidos vitrificados

Tratamiento	Día	n	Gestación (%)	$P \leq F$	IC 95%
Entero	30	30	20.0	0.25	0.50 - 0.75
	60	30	16.7		
Bipartidos	30	30	36.6	0.21	0.50 - 0.71
	60	30	33.3		

n= número de observaciones;  $P$ = valor de probabilidad menor a al valor de  $F$ ; IC= intervalo de confianza al 95%.

Con los resultados obtenidos en este estudio se concluye que es factible la aplicación de la técnica de bipartición previo a la vitrificación, a embriones bovinos producidos *in vitro*; sin embargo, esta técnica no mejora la tasa de gestación en comparación con los embriones enteros vitrificados; Así mismo, la bipartición no tuvo efecto en la pérdida gestacional al evaluarse y compararse con el tratamiento testigo. Los porcentajes de gestación obtenidos en este trabajo con embriones bipartidos se encuentran entre los parámetros reportados al transferir embriones *in vitro* enteros, demostrando su capacidad para lograr desarrollarse aún después de una microcirugía y crio preservación mediante vitrificación sin zona pelúcida completa realizada en el laboratorio, sin la necesidad de tener todo el material y equipo para bipartición en el campo.

### Agradecimientos

Agradecimientos al rastro TIF número 672 y CEDIGINE fertilización *in vitro* y a su personal por facilitar los materiales e instalaciones para llevar a cabo este estudio.

### Literatura citada:

1. Viana JHM. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technol* 2023;41(4):1-25.
2. Ferré LB, Kjelland ME, Strøbech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ. Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* 2020;14(5):991–1004.
3. Nogueira BGR, De-Souza LFA, Puelker RZ, Giometti IC, Firetti SMG, Dias TS dos SB, *et al.* Factors affecting the *in vitro* production of bovine embryos in a commercial program. *Res Soc Dev* 2021;10(2). e16110212264. DOI: 10.33448/rsd-v10i2.12264.
4. Watanabe YF, de Souza AH, Mingoti RD, Fereira RM, Batista EOS, Dayan A, *et al.* Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with *in vitro* embryo production and field fertility following embryo transfer. *Anim Reprod* 2017;14(3):635-644.
5. Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP, Lonergan P. Qualitative and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 2002;62(3):320-327.
6. Janati IS, Le Bourhis D, Lefevre A, Emond P, Le Berre L, Desnoës O, *et al.* Effects of the donor factors and freezing protocols on the bovine embryonic lipid profile. *Biol Reprod* 2022;106(3):597–612.

7. Rahbaran M, Razeghian E, Maashi MS, Jalil AT, Widjaja G, Thangavelu L, *et al.* Cloning and embryo splitting in mammals: Brief history, methods, and achievements. *Stem Cells Int* 2021;2021:1-11.
8. Do VH, Catt S, Amaya G, Batsiokis M, Walton S, Taylor-Robinson AW. Comparison of pregnancy in cattle when non-vitrified and vitrified *in vitro*-derived embryos are transferred into recipients. *Theriogenology* 2018;120:105–110.
9. Magata F, Tsuchiya K, Okubo H, Ideta A. Application of intracytoplasmic sperm injection to the embryo production in aged cows. *J Vet Med Sci* 2018;81(1):84-90.
10. Wright JM. Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. IETS Manual, 5th ed, Annex 1. 2021.
11. Lopes RFF, Forell F, Oliveira ATD, Rodriguez JL. Splitting and biopsy for bovine embryos sexing under field conditions. *Theriogenology* 2001;56(9):1383-1392.
12. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the cryotop method. *Theriogenology* 2007;67(1):73-80.
13. Bó GA, Cedeño A, Mapletoft RJ. Strategies to increment *in vivo* and *in vitro* embryo production and transfer in cattle. *Anim Reprod* 2019;16(3):411–422.
14. Zolini AM, Block J, Rabaglino MB, Tribulo P, Hoelker M, Rincon G, *et al.* Molecular fingerprint of female bovine embryos produced *in vitro* with high competence to establish and maintain pregnancy. *Biol Reprod* 2020;102(2):292-305.
15. SAS. SAS/STAT. Version 9.3. 4th ed. SAS Institute: Cary, USA; 2013. <https://support.sas.com/en/software/sas-stat-support.html>.
16. Oback F, Wei J, Popovic L, Mchowen L, Oliver J, Delaney S, *et al.* 93 blastocyst bisection to multiply biopsied and vitrified bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 2017;29(1):154.
17. Block J, Bonilla L, Hansen PJ. Efficacy of *in vitro* embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. *J Dairy Sci* 2010;93(11):5234-5242.
18. Pereira LC, Ferreira-Silva JC, Cantanhede LF, Basto SRL, Veloso Neto HF, Moura MT, *et al.* Pregnancy and delivery rates after vitrification of *in vitro*- produced Nelore (*Bos indicus*) embryos under field conditions. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2018;32(1):43-49.

19. Caamaño JN, Gómez E, Trigo B, Muñoz M, Carrocera S, Martín D, *et al.* Survival of vitrified *in vitro* produced bovine embryos after a one step warming in straw cryoprotectant dilution procedure. *Theriogenology* 2014;83(5):881-890.
20. Do VH, Walton S, Cat S, Taylor-Robinson AW. A comparative analysis of the efficacy of three cryopreservation protocols on the survival of *in vitro*-derived cattle embryos at pronuclear and blastocyst stages. *Cryobiology* 2017;(77):58-63.
21. Almiñana C, Cuello C. What is new in the cryopreservation of embryos? *Anim Reprod* 2018;(12):418-427.
22. Gjørret JO, Knijn HM, Dieleman SJ, Avery A, Larsson L, Maddox-Hyttel P. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Biol Reprod* 2003;(69):1193-1200.