

Efecto de la Dimetilformamida sobre la viabilidad posvitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro**

John Jairo Giraldo Giraldo**, Jorge Gómez Oquendo***, Neil Vásquez Araque****

Resumen

Introducción. Grandes esfuerzos se han centrado en el perfeccionamiento de la criopreservación de embriones, no obstante, uno de los principales problemas es la alta sensibilidad a la criopreservación, debido a los efectos nocivos de las bajas temperaturas y a la concentración de crioprotectores, por lo que se ha planteado el uso de combinaciones de crioprotectores con el fin de reducir el daño causado por la criopreservación. **Objetivo.** Evaluar el efecto de la Dimetilformamida (DMF) sobre la viabilidad posdevitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*. **Materiales y métodos.** Fueron distribuidos al azar 123 embriones producidos *in vitro* y vitrificados en pajillas abiertas y estiradas (OPS, *open pulled straw*), de acuerdo con los grupos de estudio (T1: DMSO + DMF 15%, T2: DMSO + DMF 20% y control: EG + DMSO 20%). Luego de la devitrificación, los embriones fueron cultivados y se determinó el porcentaje de reexpansión a las 6 horas, y el mantenimiento de la misma a las 18 horas de cultivo como parámetro de viabilidad embrionaria. **Resultados.** Al determinar los porcentajes de reexpansión de embriones vitrificados en los tratamientos T1, T2 y control, a las 6 horas (61,9%, 91,6% y 63,8%) y a las 18 horas (83,3%, 91,6% y 63,8%), se encontraron los porcentajes más altos de reexpansión en las combinaciones con DMF. **Conclusión.** La combinación de los crioprotectores 20% DMSO + 20% DMF durante la vitrificación de embriones bovinos, producidos *in vitro*, mantiene la morfología y la capacidad de reexpandir o recuperar el blastocele, después de la descongelación.

Palabras clave: criopreservación, embriones bovinos, reexpansión, vitrificación

Effect of Dimethylformamide on the post-vitrification feasibility of *in vitro* produced bovine embryos

Abstract

Introduction. Great efforts have been made in order to improve the cryopreservation of embryos. Nevertheless, one of the main problems is the sensible they are to cryopreservation, due to the bad effects of low temperatures and the concentration of cryoprotectors. Given this, the use of combinations of cryoprotectors has been proposed in order to reduce the harm produced by cryopreservation. **Objective.** To evaluate the effect of dimethylformamide (DMF) on the post-vitrification feasibility of *in vitro* bovine embryos. **Materials and methods.** 123 *in vitro* produced and vitrified in open pulled straws (OPS) embryos were randomly distributed according to the study groups (T1: DMSO + DMF 15%, T2: DMSO + DMF 20% and control: EG + DMSO 20%). After the de-vitrification, the embryos were cultivated and the re-expansion percentage was determined at 6 hours and its maintenance, at 18 hours of cultivation as a parameter of embryonic feasibility. **Results.** When the re-expansion of vitrified embryos in the T1, T2 and control were determined at 6 hours (61,9%, 91,6% and 63,8%) and at 18 hours (83,3%, 91,6% and 63,8%), the highest re-expansion percentages were found in the combinations with DMF. **Conclusion.** The combination of the 20% DMSO cryoprotectors +20% DMF during the vitrification of *in vitro* produced bovine embryos + 20% DMF during the vitrification of the bovine embryos produced, keeps the morphology and the capacity to re-expand or recover the blastocoel, after the thawing.

* Artículo derivado de la tesis de maestría "Efecto del crioprotector Dimetilformamida sobre la viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro*" realizada desde junio de 2010 a julio de 2011, financiada por el Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid y la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

** Zootecnista, especialista en Reproducción Bovina, magíster en Ciencias - Biotecnología Animal. Profesor asistente, Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias. Corporación Universitaria Lasallista.

*** Médico veterinario. Profesor titular, Facultad de Ciencias Agrarias. Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid.

**** Biólogo, magíster en Ciencias Básicas Biomédicas, Candidato a Doctor en Ciencias – Biotecnología Animal. Profesor Asociado, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

Key words: Cryopreservation, bovine embryos, re-expansion, vitrification.

Efeito da dimetilformamida sobre a viabilidade pós-vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Resumo

Introdução. Grandes esforços se centraram no aperfeiçoamento da crio preservação de embriões, não obstante, um dos principais problemas é a alta sensibilidade à crio preservação, devido aos efeitos nocivos das baixas temperaturas e à concentração de crio protetores, pelo que se propôs o uso de combinações de crio protetores com o fim de reduzir o dano causado pela crio preservação. **Objetivo.** Avaliar o efeito da Dimetilformamida (DMF) sobre a viabilidade pós-devitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Materiais e métodos.** Foram distribuídos a esmo 123 embriões produzidos *in vitro*

e vitrificados em semem abertas e esticadas (OPS, open pulled straw), de acordo com os grupos de estudo (T1: DMSO + DMF 15%, T2: DMSO + DMF 20% e controle: EG + DMSO 20%). Depois da devitrificación, os embriões foram cultivados e se determinou a percentagem de reexpansión às 6 horas, e a manutenção da mesma às 18 horas de cultivo como parâmetro de viabilidade embrionária. **Resultados.** Ao determinar as percentagens de re-expansão de embriões vitrificados nos tratamentos T1, T2 e controle, às 6 horas (61,9%, 91,6% e 63,8%) e às 18 horas (83,3%, 91,6% e 63,8%), encontraram-se as percentagens mais altas de re-expansão nas combinações com DMF. **Conclusão.** A combinação dos crio protetores 20% DMSO + 20% DMF durante a vitrificação de embriões bovinos, produzidos *in vitro*, mantém a morfologia e a capacidade de reexpandir ou recuperar o blastocele, depois do descongelamento.

Palavras importante: crio preservação, embriões bovinos, re-expansão, vitrificação

Introducción

La criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro* facilita el uso de programas de transferencia de embriones, el establecimiento de bancos de germoplasma con acceso permanente a material genético de un determinado individuo o raza, e igualmente facilita las biotecnologías asociadas como clonación y transgénesis¹. En materia de criopreservación, el desarrollo de tecnologías en la última década ha sido significativo. Una muestra de tales avances la constituye el campo de la reproducción en donde se ha hecho rutinario abordar el proceso de criopreservación de semen, oocitos, embriones o tejido gonadal con el fin de satisfacer la demanda cada vez más creciente por los métodos y servicios de la reproducción asistida². El valor de la criopreservación en la reproducción asistida en bovinos queda claramente ilustrado por el gran número de gametos y embriones que son congelados y transferidos cada año³. No obstante, es necesaria la búsqueda de protocolos de vitrificación en los que se evalúen combinaciones de crioprotectores que permitan mejorar la viabilidad embrionaria⁴.

El tipo de crioprotector usado, sus posibles combinaciones y su concentración son variables del proceso de vitrificación, que influyen

directamente sobre las tasas de supervivencia de los embriones. La dimetilformamida (DMF) es un crioprotector permeable perteneciente al grupo de las aminas, y se considera que por su bajo peso molecular este crioprotector⁵ puede ser más fácilmente absorbido por los embriones y menos tóxico en el proceso de vitrificación⁶. Estas características proponen a la DMF como alternativa de ser usada como crioprotector intracelular en la vitrificación de embriones bovinos y evaluar su efecto sobre la viabilidad, determinada a través de la reexpansión del blastocele.

Materiales y métodos

Localización. La investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, y el material biológico para la obtención de los complejos cúmulo oocito (CCO) fue suministrado por la planta de faenado de la Central Ganadera de Medellín y la planta de sacrificio del municipio de Girardota.

Obtención de CCO de bovino. Los ovarios bovinos recolectados se depositaron en solución de tampón fosfato salino (PBS) estéril a 37°C y transportados al Laboratorio de Biotec-

nología Animal. Con aguja hipodérmica 18G y jeringa de 5 ml, se procedió a la aspiración de los folículos con un diámetro de 3 a 6 mm y el aspirado fue recolectado en tubos cónicos de 15 mL a 37°C. El líquido folicular obtenido de los ovarios fue centrifugado a 1500 rpm, por 5 minutos, y el precipitado se resuspendió en 1 ml de medio de lavado TCM-199 con sales de Hank's (Sigma M2520, Sigma-Aldrich Inc., USA, Spruce St. St. Louis, MO), suplementado con 275 µg/mL de ácido pirúvico (Sigma P2506, Sigma-Aldrich Inc., USA, Spruce St. St. Louis, MO), 29.2 µg/mL de glutamina (Sigma G9003, Sigma-Aldrich Inc., USA, Spruce St. St.

Louis, MO Sigma-Aldrich Inc., USA, Spruce St. St. Louis, MO), 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 0.25 µg/mL de anfotericina B (Sigma A5955, Sigma-Aldrich Inc., USA, Spruce St. St. Louis, MO). En caja de petri estéril de 60 x 15 mm, bajo visión con estereomicroscopio, se seleccionaron los complejos CCO de buena calidad, según los criterios previamente establecidos (tabla 1)⁷. Los CCO seleccionados fueron lavados en medio TCM 199 y en grupos de diez CCO se cultivaron a 38.5 °C en gotas de 50 µl de medio de maduración, cubiertas con aceite mineral en cajas de petri medianas 60 x 10 mm.

Tabla 1. Categorías de complejos cúmulo oocito para procesos de FIV⁷

Tipo	Células del cúmulo	Citoplasma
1 Excelente	Capas múltiples y compactas de células (cuatro o más)	Homogéneo y transparente
2 Bueno	Capas múltiples de células (entre una y tres)	Homogéneo con zonas periféricas oscuras
3 Regular	Sin células (Denedados)	Irregular con zonas oscuras
4 Malo	Células expandidas	Irregular con zonas oscuras

Maduración y fertilización *in vitro* de oocitos. Los CCO fueron incubados por 24 horas en grupos de 10 por gota de 50 µl de medio de maduración (Gibco 11150-067, Life Technologies Corporation; USA, Grand Island, NY) suplementado con 0.33 mM de piruvato de sodio, 1µg/mL de Estradiol, 3% de suero fetal bovino SFB, 6 mg/ml de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (BSA FAF, Sigma A6003), solución antibiótica (penicilina 100 UI/ml; estreptomina 100 mg/ml; anfotericina B 0.25 mg/ml) (Sigma A5955, Sigma-Aldrich Inc., USA, Spruce St. St. Louis, MO) y gonadotropinas (rhLH 5 µg/ml (Luveris, Merck Serono S.A, Germany, Darmstadt), pFSH 1 µg /ml (Sigma F2293, Sigma-Aldrich Inc., USA, Spruce St. St. Louis, MO). Las gotas fueron cubiertas con aceite mineral (Sigma M8410 Sigma-Aldrich Inc., USA, Spruce St. St. Louis, MO) e incubadas a 38.5°C, 5% CO₂ en aire con 100% de humedad por 24 horas. Posteriormente, al terminar el tiempo de incubación, los CCO fueron sometidos a fertilización, para lo cual, los oocitos fueron transferidos a gotas de 50 ml de medio FERT-talp (Sigma® A331, Sig-

ma® P4562, GIBCO® 11140-050, Químicos JM®) suplementado con 10 µl/ml de solución antibiótica (Sigma® A5955, Sigma-Aldrich Inc., USA, Spruce St. St. Louis, MO), 10 mM de hipotaurina (Sigma® H1384), 1 mM de epinefrina (Sigma® E4642), 2 U/mL de heparina (Sigma® H0519) y una concentración espermática de 2 x 10⁶ espermatozoides/ml. Las condiciones de fertilización fueron de 38.5°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa durante 18 horas⁸.

Desarrollo *in vitro*. A las 18 horas post-inseminación (hpi), los presuntos cigotos fueron desnudados de las células del cúmulo y cultivados durante 72 horas en gotas de 50 µl de medio de desarrollo KSOM-Evolve (ZenithBiotech, USA, Guilford, CT) suplementado con 3% de SFB, 6 mg/ml de BSA-FAF, 0.33mM de piruvato de sodio y 10 µl/ml de solución antibiótica. Las condiciones de cultivo fueron 38.5°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Después de las 72 horas de cultivo, se realizó un recambio del medio del 50% y se continuó el cultivo por 96 horas adicionales⁹. Al finalizar este tiempo, los blastocistos obtenidos fueron clasifica-

dos con base en los criterios de la sociedad de transferencia de embriones IETS (tabla 2)¹⁰, y

sometidos al proceso de vitrificación de acuerdo a los grupos de estudio.

Tabla 2. Morfología según el estado embrionario¹⁰

Estado embrionario	Morfología
Blastocisto inicial (BI)	Aparece el blastocele (cavidad) en el interior del embrión, ocupa el 70-80% del espacio perivitelino en el cual se forma la cavidad interna. Se puede diferenciar el trofoblasto y la masa celular.
Blastocisto (BL)	Diferenciación evidente entre trofoblasto y la masa celular interna, ocupa la mayor parte del espacio perivitelino, el blastocele abarca más del 50% del embrión.
Blastocisto Expandido (BX)	El diámetro del embrión aumenta considerablemente y se adelgaza la zona pelúcida, ocupando el 100% del espacio perivitelino.

Vitrificación de embriones. Los embriones en estadio de blastocisto (BL) fueron vitrificados de acuerdo con los siguientes grupos de estudio: Grupo control (C), los blastocistos fueron incubados por 30 segundos en la solución V1 (C) compuesta de 10% etilenglicol (EG) + 10% de dimetilsulfoxido (DMSO), en medio TCM-199 HEPES (Sigma M7528) suplementado con 20% de SFB, a una temperatura de 38.5°C. Luego fueron transferidos durante 25 segundos a una solución V2 (C) compuesta de 20% de EG + 20% de DMSO y 0.5 M de sucrosa, en medio TCM 199 HEPES suplementado con 20% de SFB⁶

Los grupos experimentales fueron: Tratamiento 1 (T1), los blastocistos fueron incubados por 30 segundos en la solución V1 (T1) compuesta de 7,5% DMF + 7,5% de DMSO, en medio TCM-199 HEPES suplementado con 20% de SFB, a una temperatura de 38.5°C. Luego fueron transferidos durante 25 segundos a una solución V2 (T1) compuesta de 15% de DMF + 15% de DMSO y 0.5M de sucrosa, en medio TCM 199 HEPES suplementado con 20% de SFB. Tratamiento 2 (T2), los blastocistos fueron incubados por 30 segundos en la solución V1 (T2) compuesta de 10% DMF + 10% de DMSO, en medio TCM-199 HEPES suplementado con 20% de SFB, a una temperatura de 38.5°C. Luego fueron transferidos durante 25 segundos a una solución V2 (T2) compuesta de 20% de DMF + 20% de DMSO y 0.5M de sucrosa, en medio TCM 199 HEPES suplementado con 20% de SFB.

Los embriones fueron vitrificados en pajillas abiertas y estiradas (OPS, *open pulled straw*), en 2 µl de la solución crioprotectora V2 de cada grupo experimental, correspondiente al volumen de la gota desde la cual dos o tres embriones fueron cargados por capilaridad, en cada OPS¹¹, e inmediatamente fueron sumergidas en nitrógeno líquido dentro de los siguientes 25 segundos, para ser mantenidas allí hasta su devitrificación¹².

Devitrificación de embriones. Para la devitrificación de los embriones, cada OPS fue retirada del nitrógeno líquido y sumergida en medio TCM-199 HEPES (Sigma M2520, Sigma-Aldrich Inc., USA, Spruce St. St. Louis, MO) con 20% de SFB y 0.25 M de sucrosa a 38.5°C, por 5 minutos y se verificó que los embriones fueron expelidos en el medio. Luego, los embriones fueron transferidos a gotas de medio TCM-199 HEPES con 20% de SFB y 0.15 M de sucrosa por 5 minutos^{13, 14}. Finalmente, los embriones fueron transferidos a medio de desarrollo a 38.5°C.

Determinación de la criotolerancia. Para determinar la viabilidad embrionaria se tuvieron los siguientes parámetros morfológicos: la integridad de la zona pelúcida (sin presencia de fracturas), el porcentaje de reexpansión completo, en donde se observa un blastocele que reexpande alrededor de un 50% del embrión y que ocupa casi todo el espacio paravitelino a las 6 horas, y el mantenimiento de esta condición en su morfología a las 18 horas posdevitrificación^{15,16}. Estos parámetros fueron evalua-

dos en cada embrión devitrificado, utilizando un estereomicroscopio (Nikon Instruments Inc., USA, Melville, NY).

Análisis estadístico. El diseño experimental fue definido como un diseño de bloques completos al azar. Los grupos de trabajo tuvieron seis a siete réplicas para un total de 37 a 45 embriones por tratamiento, y 123 embriones totales. Los porcentajes de reexpansión a las 6 y 18 horas de los embriones devitrificados de cada réplica fueron sometidos a un ANOVA, seguido de una comparación de medias utilizando el test de Tukey del programa Statística versión 10.0 (StatSoft, USA, Tulsa Oklahoma). Las comparaciones de las medias con un $p < 0.05$ fueron consideradas significativas.

Resultados

Un total de 123 embriones producidos *in vitro* fueron distribuidos al azar y sometidos a vitrificación, de acuerdo con los grupos de estudio (T1, T2 y C). Luego de la devitrificación, los embriones fueron cultivados y se determinó el porcentaje de reexpansión a las 6 horas de cultivo como parámetro indicativo de la sobrevivencia embrionaria^{17,18} (figura 1), en donde se observó un porcentaje de reexpansión del 61.9% en el T1, 91.6% en el T2 y 63.8% para el grupo C (tabla 3). El porcentaje promedio de reexpansión obtenido en el T2 fue mayor estadísticamente significativo ($p < 0,05$) que el encontrado en los tratamientos T1 y C, en los cuales se encontró un respuesta similar ($p > 0,05$).

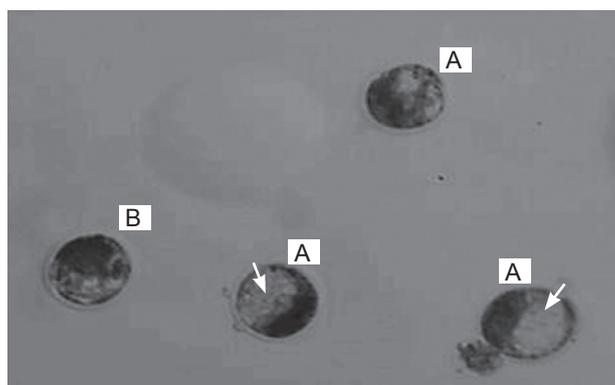


Figura 1. Embriones bovinos producidos in vitro, devitrificados. Embriones reexpandidos a las 6 y 18 horas (A); embriones que no logran reexpandir a las 6 y 18 horas (B). La flecha indica la recuperación del blastocele

Tabla 3. Porcentaje de reexpansión de embriones devitrificados a las 6 horas

Tratamiento	Media	n Número de Procesos	Total embriones evaluados	Desviación Estándar	Error Estándar
T1 DMF 15% + DMSO 15%	61.9 ^a	6	41	14.58	5.95
T2 DMF 20% + DMSO 20%	91.6 ^b	6	37	10.21	4.17
C EG 20% + DMSO 20%	63.8 ^a	7	45	2.27	0.86

La comparación de medias se realizó mediante el test de Tukey; letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Evaluación del mantenimiento de reexpansión a las 18 horas, de embriones devitrificados

El mantenimiento de la reexpansión es uno de los parámetros más utilizados para validar la sobrevivencia embrionaria¹⁹, por lo cual se determinó el porcentaje de reexpansión a las 18

horas de cultivo, posteriores a la devitrificación. Al comparar los porcentajes de reexpansión de los embriones bovinos producidos *in vitro* devitrificados, se encontró que los tratamientos con DMF (T1 y T2) presentaron los porcentajes más altos de reexpansión (83.33 y 91.66%, respectivamente), con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con el grupo C (63.85%) (tabla 4). A pesar de que el porcentaje de reexpansión obtenido en el tratamiento 2 (91.66) fue mayor que el tratamiento 1 (83.33%), no se encontró diferencia estadística ($p > 0,05$).

Tabla 4. Porcentaje de reexpansión de embriones devitrificados a las 18 horas

Tratamiento	Media	n Número de Procesos	Total embriones evaluados	Desviación Estándar	Error Estándar
T1 DMF 15% + DMSO 15%	83.3 ^a	6	41	10.21	4.17
T2 DMF 20% + DMSO 20%	91.6 ^a	6	37	10.21	4.17
C EG 20% + DMSO 20%	63.8 ^b	7	45	2.27	0.86

La comparación de medias se realizó mediante el test de Tukey; letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Discusión

Grandes esfuerzos se han centrado en el desarrollo o perfeccionamiento de la criopreservación de embriones producidos tanto *in vivo* como *in vitro*, generando aportes significativos para masificar el uso de la técnica de transferencia de embriones a gran escala²⁰. Sin embargo, la supervivencia de los embriones bovinos producidos *in vitro* devitrificados puede ser afectada por diversos factores, como la suplementación y las condiciones de cultivo; entre los suplementos más utilizados está el suero fetal bovino (SFB)²¹, en donde los embriones producidos con este suplemento tienen una acumulación intracelular de lípidos anormales²², menor supervivencia^{23, 19}, y disminución en la tasa de eclosión de los embriones después de su descongelación^{19, 15}. Debido a lo anterior, para este trabajo se suplementó el medio de cultivo con 3% de SFB (7% menos SFB que en las concentraciones habituales) y

6 mg/ml de BSA-FAF, donde el efecto de la disminución del suero se ha asociado con un bajo índice de apoptosis²⁴, mayor criotolerancia y un patrón de expresión génica relacionado con calidad embrionaria¹⁹.

Adicional a las condiciones de cultivo, otro factor crucial es la alta sensibilidad de los embriones a la criopreservación, debido a los efectos nocivos de las bajas temperaturas y la concentración de crioprotectores, por lo que se han planteado estudios con el objetivo de reducir el daño causado por la criopreservación, mediante el uso de combinaciones de crioprotectores^{2, 25}, y tiempos de exposición¹⁹. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la dimetilformamida (DMF) en dos diferentes concentraciones (15% y 20%): en combinación con DMSO (15% y 20%), y como grupo control EG 20% + DMSO 20%, en embriones bovinos producidos *in vitro*. Al evaluar la morfología de los embriones devitrificados a las 6 horas de cultivo, se encontró un porcentaje de reexpansión en el grupo control (EG 20% + DMSO 20%) del 63,8%, el cual es mayor que el descrito por Carvalho en 2006⁶ (54,3%), y menor que el reportado por Camargo et al., en el 2004²⁶ (79%). Sin embargo, los

porcentajes de reexpansión obtenidos al utilizar las concentraciones de 15% y 20% de DMF en combinación con el DMSO fueron de 61,9% y 91,6%, respectivamente (tabla 3). Adicionalmente, el mantenimiento de la reexpansión de los embriones devitrificados, utilizado como uno de los parámetros para evaluar la sobrevivencia de los embriones sometidos a la criopreservación¹⁹, determinó el porcentaje de reexpansión a 18 horas, en donde los grupos que presentaron los porcentaje más altos fueron aquellos que tenían las concentraciones DMSO + DMF 15% y DMSO + DMF 20% (83,3% y 91,6%, respectivamente) (tabla 4), similares a los reportados por Laparatova y colaboradores²⁷, Kuwayama *et al.*²⁸ con 87%, Dinnyes *et al.*²⁹ con 81%, Mahmoudzadeh *et al.*³⁰ con un 69-89% y Vajta *et al.*³¹ con un 84%. Mientras que el control presentó un 63,8% de reexpansión, similar a los obtenidos por Donnay *et al.*³² con un 67%, y Camargo *et al.*²⁶ con 67%, pero superior a las reportadas por Varago *et al.*³³ con un 33-44% de reexpansión y Guerra *et al.*²⁵ con un 40% de reexpansión.

Estos resultados benéficos obtenidos con el uso de la dimetilformamida (DMF) como agente crioprotector pueden ser debidos a la disminución en la tendencia de formación de cristales de hielo durante el enfriamiento, y al aumento de la estabilidad del estado amorfo durante la descongelación, características que son comparables al DMSO, pero más eficientes que el glicerol y el etilen glicol³⁴. Además, su toxicidad ha sido evaluada en cultivo de embriones de diferentes especies, tales como, crustáceos³⁵, peces³⁶, roedores³⁷, por último en bovinos se ha evaluado como agente crioprotector en combinación con EG o DMSO en oocitos y embriones⁶.

Conclusiones

La dimetilformamida puede ser considerada una alternativa viable para la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*, dado que en concentraciones del 20% y en combinación con otros crioprotectores, demuestra ejercer una protección sobre la integridad de la membrana celular y la morfología normal de los embriones bovinos.

Referencias bibliográficas

1. ALBARRACÍN MONJE, J. Vitrificación de oocitos bovinos mediante la técnica open pulled straw: Estudio estructural de cromosomas, microtúbulos, y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario *in vitro*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, 2005.
2. RODRÍGUEZ, P. Vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*. VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba IRAC, 2009.
3. THIBIER, M. International Embryo Transfer Society. Data Retrieval Committee Statistics of Embryo Transfer, Year 2007. IETS Embryo Transfer Newsletter 2008.
4. CABRERA, P.; *et al.* Vitrificación: una alternativa para la criopreservación de embriones. En: Rev. Fac. Cienc. Vet. Maracay. 2006. Vol. 47, N°1.
5. KENNEDY, Jr. Biological effects of acetamide, formamide, and their monomethyl and dimethyl derivatives. En: Crit. Rev. Toxicol. 1986. Vol 9, p. 129-182
6. CARVALHO, E. Vitrificação de ovócitos e embriões bovinos utilizando-se etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida como agentes crioprotectores. (tese apresentada junto ao programa de pós-graduação em medicina veterinária para obtenção do título de doutora). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista. 2006. 121 p.
7. DE WIT, C.; WURTH, Y. and KRUIP, Th. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. En: J. Anim. Sci. 2000. Vol. 78, p. 1277-1283
8. DODE, A.; PEREIRA, D. and RUMPF, R. Evaluation of different culture systems on the *in vitro* production of bovine embryos. En: Theriogenology. 2005. Vol. 63, N°4, p. 1131-1141.
9. GANDHI, A. P, *et al.* A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. En: Hum Reprod. 2000. Vol. 15, N° 2, p. 395-401
10. DE COSIO, M. A. Morfología y evaluación de embriones. En: Simposio Regional de Reproducción Bovina. 2008. p. 5.
11. GUIGNOT, F. Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. En: INRA Prod Anim. 2005. Vol. 18, N°1, p. 27-35
12. VAJTA, G. Oocyte and embryo vitrification. En: Reprod. Domest Anim. Suppl 2000c. p. 45-48

13. DODE, A.; PEREIRA, D. and RUMPF, R.; Op. cit., p. 1131-1141
14. VAJTA, G.; *et al.* Open Pulled Straw (OPS) vitrification of cattle oocytes. En: Theriogenology. 1998b. Vol. 49, p. 176.
15. MUCCI, N.; *et al.* Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. En: Theriogenology. 2006. Vol. 65, p. 1551-1562.
16. MOORE, K.; *et al.* *In vitro* production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development. Cryotolerance and survival to term. En: Theriogenology. 2007. Vol. 68, p. 1316-1325.
17. SILVA, M. y BERLAND, A. Vitrificación de blastocistos bovinos producidos *in vitro* con el método Open Pulled Straw (OPS): Primer reporte. En: Arch. Med. Vet. 2004. Vol. 36, N°1.
18. CAMARGO, L. S. Producción *in vitro* de embriones. EMBRAPA. Primer Encuentro Internacional de Biotecnología. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, 2008.
19. RIZOS, A; *et al.* Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. En: Biol Reprod. 2003. Vol. 68, p. 236-243
20. DINNYES, A.; *et al.* Criopreservação de embriões mamíferos. En: Acta Sci Vet. 2006. Vol. 1, p. 171-190.
21. SEIDEL, G. Jr. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. En: Theriogenology. 2006. Vol. 65, p. 228-235
22. ABE, H.; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum free media. En: Journal of Reproducción and Development. 2003. Vol. 49, N°3, p. 193-202
23. ABE, H.; *et al.* Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. En: Mol Reprod Dev. 1999. Vol. 5, p. 325-335
24. SUDANO, M. J. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. En: Theriogenology. 2011. Vol. 75 N°7: 1211-1220
25. GUERRA, A.; *et al.* Evaluación de tres protocolos de criopreservación de embriones bovinos obtenidos *in vitro* e *in vivo*. En: IX Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba IRAC, 2011. p. 309
26. CAMARGO, L.; *et al.* Comparación of two vitrification protocols for crossbred Bos taurus x Bos indicus *in vitro* produced embryos. En: Conferencia Anual International Embryo Transfer Society IETS, Reproduction, Fertility and Development, 2004. p. 164
27. LOPATAROVA, M.; CECH, S. and HAVLICEK, L. Effect of Vitrification in Open Pulled Straws on Survival of Bovine Embryos from Superovulated Cows. En: Acta Vet Brno. 2002. Vol. 71, p. 93-99
28. KUWAYAMA, M.; HAMANO, S. and NAGAI, T. Vitrification of bovine blastocysts obtained by *in vitro* culture of oocytes matured and fertilized in vitro. En: Journal Reprod Fertil. 1992. Vol. 96, p. 187-193
29. DINNYES, A.; *et al.* In vitro survival of *in vitro* produced bovine embryos frozen or vitrified by techniques suitable for direct transfer. En: Theriogenology. 1995. Vol. 43, p. 197.
30. MAHMOUDZADEH, AR.; *et al.* Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos procedure for bovine embryos produced *in vitro*: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. En: Journ Reprod Fertil. 1995. Vol. 103, p. 33-39
31. VAJTA, G.; *et al.* Direct in-straw rehydration after thawing of vitrified *in vitro* produced bovine blastocysts. En: Vet. Rec.1995. Vol. 137, p. 672
32. DONNAY, I.; *et al.* Vitrification of *in vitro* produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. En: Anim Reprod Sci. 1998. Vol. 52, p. 93-104.
33. VARAGO, K. Vitrification of *in vitro* produced Zebu embryos. En: Anim. Reprod Sci. 2006. Vol. 3, N°3, p. 353-358
34. BAUDOT, A. and BOUTRON, P. Glass forming tendency and stability of aqueous solutions of diethylformamide and dimethylformamide. En: Cryobiology. 1998. Vol. 37, p. 187-199.
35. HUANG, X.; *et al.* Effects of cryoprotectant toxicity on embryos of the Chinese Mitten Crab, *Eriocheir sinensis* (Decapoda brachyura). En: Crustaceana. 2011. Vol. 84, N°3, p. 281-291
36. CHEN, S. L. and TIAN, Y. S. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. En: Theriogenology. 2005. Vol. 63, p. 1207-1219
37. AUGUSTINE-RAUCH, K; *et al.* A study of vehicles for dosing rodent whole embryo culture with non aqueous soluble compounds. En: Reprod Toxicol. 2004. Vol. 18, p. 391-398.