

**EFFECTO DEL CRIOPROTECTOR DIMETILFORMAMIDA SOBRE LA
VIABILIDAD DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *IN VITRO***

JOHN JAIRO GIRALDO GIRALDO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE MEDELLÍN

FACULTAD DE CIENCIAS

2011



**EFFECTO DEL CRIOPROTECTOR DIMETILFORMAMIDA SOBRE LA
VIABILIDAD DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *IN VITRO***

JOHN JAIRO GIRALDO GIRALDO

Tesis de Grado presentada para optar el Título de

Magíster en Ciencias - Biotecnología

Director

NEIL ALDRIN VÁSQUEZ ARAQUE

Biólogo, M.Sc, Dr. Sc (c)

Codirector

JORGE GÓMEZ OQUENDO

Médico Veterinario

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE MEDELLÍN

FACULTAD DE CIENCIAS

2011

CONTENIDO

RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	12
2. MARCO TEÓRICO	14
2.1. Producción <i>in vitro</i> de embriones	14
2.2. Criopreservación de embriones	15
2.2.1. Vitricación vs congelamiento convencional	17
2.2.2. Vitricación	18
2.2.3. Devitricación	24
2.3. La dimetilformamida como crioprotector	25
2.4. Criotolerancia	26
2.5. Peroxidación lipídica	29
2.5.1. Proceso de la peroxidación lipídica	29
2.5.2. Como medir el daño oxidativo	31
2.5.3. Determinación de sustancias reactivas de oxígeno EROS con el ácido cis parinarico (CAP)	31
2.5.4. Usos de la 2,7-Dichlorodihydrofluoresceina Diacetato (H₂DCFDA) ...	32
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo general	34
3.2. Objetivos específicos	34
4. METODOLOGÍA	35
4.1. Localización	37
4.2. Procesamiento del material de estudio	37
4.3 Maduración <i>in vitro</i> de oocitos	38
4.4 Fertilización <i>in vitro</i>	39
4.5 Desarrollo <i>in vitro</i>	40
4.6 Vitricación y criotolerancia	42
4.6.1. Vitricación de embriones	42
4.6.2. Devitricación de embriones	44
4.6.3. Determinación de la criotolerancia y la morfología embrionaria	45
4.7 Cuantificación de la peroxidación lipídica	46

4.7.1. Evaluación del Malondialdehido (MDA).....	46
4.7.2. Determinación del contenido de sustancias reactivas con Diclorofluoroceina Diacetato.	46
4.7.3. Determinación de sustancias reactivas de oxígeno con el ácido cis-parinámico (CAP). ..	47
4.8. Análisis estadístico.....	48
5. RESULTADOS	49
5.1. Evaluación del crioprotector dimetilformamida sobre la morfología de embriones devitrificados.....	49
5.2 Evaluación del mantenimiento de reexpansión a las 18 horas, de embriones devitrificados.....	51
5.3 Cuantificación de la peroxidación lipídica.....	55
5.3.1. Cuantificación de la peroxidación lipídica en medios de cultivo	55
5.3.2. Cuantificación de la peroxidación lipídica en embriones devitrificados ..	58
5.4 Cuantificación de los niveles de especies reactivas de oxígeno EROS en embriones bovinos producidos <i>in vitro</i> devitrificados.....	61
6. DISCUSIÓN	66
7. CONCLUSIONES	73
AGRADECIMIENTOS	74
BIBLIOGRAFÍA	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Total de embriones transferibles y transferidos frescos y congelados según el año de producción en el mundo	15
Figura 2. Pajilla abierta y estirada (<i>Open pulled straw</i> , OPS),	22
Figura 3. Estructura química de la dimetilformamida DMF	25
Figura 4. Formación de las sustancias genotóxicas, durante la peroxidación lipídica	30
Figura 5. Estructura química del Cis Acido Parinarico.	32
Figura 6. Blastocisto inicial (Bi)	40
Figura 7. Blastocisto (Bl)	41
Figura 8. Blastocisto expandido (Bx)	41
Figura 9. Gotas de mezcla de los crioprotectores y pajillas abiertas y estiradas (OPS) usadas para la vitrificación de embriones bovinos producidos <i>in vitro</i>	44
Figura 10. Material usado en la devitrificación de embriones bovinos producidos <i>in vitro</i>	45
Figura 11. Porcentaje de reexpansión a las 6 horas, de embriones devitrificados	51
Figura 12. Embriones bovinos producidos <i>in vitro</i> , devitrificados	53
Figura 13. Comparación de las medias del porcentaje de reexpansión a las 18 horas, de embriones devitrificados.	54

Figura 14. Concentración de Malondialdehído en los medios de cultivo en cada uno de los grupos. 57

Figura 15. Porcentaje de Malondialdehído (MDA) en el medio de cultivo sin embriones 58

Figura 16. Porcentaje de de Fluorescencia CAP en embriones bovinos devitrificados 60

Figura 17. Comparación de las medias de pendientes de fluorescencia H₂DCFDA en embriones bovinos producidos *in vitro* devitrificados. 64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tasas de reexpansión de embriones, posterior a su devitrificación.....	23
Tabla 2. Categorías de complejos cúmulo oocito para procesos de FIV	38
Tabla 3. Parámetros estadísticos del porcentaje de reexpansión de embriones devitrificados a las 6 horas	50
Tabla 4. Análisis de la varianza (ANOVA) del porcentaje de la de reexpansión a las 6 horas, de embriones bovinos producidos <i>in vitro</i> devitrificados.....	50
Tabla 5. Comparación de medias del porcentaje de reexpansión de embriones devitrificados a las 6 horas, mediante el test de Tukey.....	50
Tabla 6. Parámetros estadísticos del porcentaje de reexpansión a las 18 horas, de embriones devitrificados.....	53
Tabla 7. Análisis de la varianza (ANOVA) del porcentaje de la de reexpansión a las 18 horas, de embriones bovinos producidos <i>in vitro</i> devitrificados.....	53
Tabla 8. Comparación de medias del porcentaje de reexpansión a las 18 horas, de embriones devitrificados, mediante el test de Tukey.....	54
Tabla 9 Parámetros estadísticos para la cuantificación de Malondialdehido (MDA) en el medio de reexpansión	56

Tabla 10 Análisis de la varianza (ANOVA) del promedio de la concentración de Malondialdehido (MDA) en el medio de reexpansión.	56
Tabla11 Comparación de medias de la concentración de MDA en el medio de reexpansión de embriones devitrificados a las 18 horas, mediante el test de Tukey.	57
Tabla12 Parámetros estadísticos para el porcentaje de Malondialdehido (MDA) con respecto al medio de cultivo sin embriones.	58
Tabla 13 Porcentaje de fluorescencia CAP en embriones bovinos producidos <i>in vitro</i> devitrificados.	59
Tabla 14 Análisis de la varianza (ANOVA) del porcentaje de fluorescencia CAP en embriones devitrificados.	59
Tabla 15 Comparación de medias del porcentaje de fluorescencia CAP en embriones devitrificados, mediante el test de Tukey.	60
Tabla 16 Parámetros estadísticos de pendientes de fluorescencia H ₂ DCFDA en embriones bovinos producidos <i>in vitro</i> devitrificados	61
Tabla 17 Análisis de la varianza (ANOVA) de las pendientes de fluorescencia del H ₂ DCFDA en embriones bovinos producidos <i>in vitro</i> devitrificados.	62
Tabla 18 Comparación de medias de pendientes de fluorescencia H ₂ DCFDA en embriones bovinos producidos <i>in vitro</i> devitrificados, mediante el test de Tukey.	63
Tabla 19 Efecto de la vitrificación sobre el porcentaje de aumento de la fluorescencia	65

Tabla 20 Efecto del tratamiento de vitrificación sobre el aumento de la fluorescencia

65



RESUMEN

En materia de criopreservación, el desarrollo de tecnologías en la última década ha sido significativo. Una muestra de tales avances lo 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 cada vez más creciente demanda por los métodos y servicios de la reproducción asistida. 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 año.

Dado que las aplicaciones mencionadas tienen una gran importancia tanto científica como comercial se hace necesario desarrollar y evaluar nuevos procedimientos, en donde a partir de embriones criopreservados sea posible obtener preñeces viables de manera eficiente.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del crioprotector Dimetilformamida (DMF) bajo la técnica de la vitrificación y la viabilidad de los embriones bovinos producidos *in vitro* sometidos a este proceso de criopreservación mediante la reexpansión, la cuantificación de la peroxidación lipídica y de las especies reactivas de oxígeno EROS.

Se realizó una comparación entre las tasas de reexpansión de los embriones posterior a su devitrificación. Además se determinaron los niveles de las especies reactivas de oxígeno y la cuantificación de la peroxidación lipídica como criterio de calidad embrionaria. Las tasas de reexpansión a las 18 horas, con los tratamientos: control (EG 20%-DMSO 20%), tratamiento 1 (T1: DMF 15%-DMSO 15%) y tratamiento 2 (T2: DMF 20%-DMSO 20%), fueron del 63,8%, 83,3% y 91,6%, respectivamente, presentando diferencia estadística ($P < 0.05$) al comparar los grupos DMF (T1 y T2) con el control. Al comparar producción de especies reactivas de oxígeno EROS en embriones devitrificados, fue mayor estadísticamente ($p < 0.05$) en los embriones del T1 comparado con los otros grupos de estudio. Resultados similares fueron encontrados al

cuantificar las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico TBARs en el medio de cultivo de los embriones devitrificados, en donde el medio del T1 fue mayor significativamente ($p < 0.05$) que los demás grupos de estudio. Con respecto a los niveles de peroxidación lipídica en los embriones, mediante la oxidación de cis-ácido parinámico CAP, el T2 presentó los menores niveles de peroxidación ($p < 0.05$) al compararlo con los demás grupos de estudio.

Los embriones vitrificados usando la combinación de los crioprotectores DMSO + DMF a una concentración del 20%, presentan una mayor supervivencia, reflejada en el porcentaje de reexpansión y peroxidación lipídica, sin embargo es necesario implementar otras evaluaciones de la calidad embrionaria y tasa de implantación, que permitan adoptar este protocolo en la criopreservación de embriones bovinos.

Palabras claves: Reexpansión, supervivencia embrionaria, vitrificación

1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 20 años, se ha observado que la producción de embriones bovinos, ha crecido de forma progresiva, en especial en el área de la producción *in vitro* (PIV), lo que ha hecho que esta se convierta en una técnica importante no sólo a nivel académico sino también a nivel comercial.

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 transgénesis (Albarracin, 2005). En materia de criopreservación el desarrollo de tecnologías en la última década ha sido significativo. Una muestra de tales avances lo 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 asistida (Rodríguez, 2009). 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 año (Thibier, 2007).

Consecuentemente, esto ha generado la necesidad de la criopreservación de los embriones excedentes de dicha producción. Sin embargo, la criopreservación de esta clase de embriones, por medio de métodos convencionales de congelamiento, no ha alcanzado tasas de sobrevivencia satisfactorias (Vajta, 2000), lo que ha llevado a la utilización de otros métodos como es la vitrificación. Este método, con curvas de enfriamiento superiores a las del congelación lenta, permite la reducción del tiempo de exposición del embrión en los puntos críticos de temperatura, disminuyendo así los daños térmicos y mecánicos causados durante la formación de hielo y aumentando la viabilidad de los embriones posterior a su vitrificación (Lazar, 2000; Vajta y Kuwayama, 2006; Cuello et al, 2007; Guerra et al, 2011).

No obstante, es importante resaltar, que a pesar del alcance conseguido con estas técnicas hasta hoy, aun es necesario el desarrollo de nuevos métodos de criopreservación y la evaluación de nuevos crioprotectores que puedan ser usados en la vitrificación de embriones y el efecto de estos sobre la viabilidad embrionaria, y desarrollar nuevos protocolos que permitan hacer más eficiente el proceso de criopreservación en términos de la descendencia lograda a partir de embriones criopreservados por este método. (Celestinos y Gatica, 2002). Se hace necesario por lo tanto contribuir a la búsqueda de un protocolo de criopreservación de embriones y una buena combinación de crioprotectores que permitan mejorar la sobrevivencia embrionaria y las tasas de preñez (Cabrera et al, 2006)

La dimetilformamida (DMF) es un crioprotector permeable perteneciente al grupo de las aminas, y se considera que por su bajo peso molecular este crioprotector puede ser mas fácilmente absorbido por los embriones y ser menos tóxico aumentando la sobrevivencia de estos en el proceso de vitrificación (Kennedy, 1986; Carvalho, 2006). Estas características proponen a la DMF como alternativa de ser usada como crioprotector intracelular en la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*, para lo cual se evaluarán dos concentraciones diferentes del crioprotector mencionado, sus efectos posdevitrificación, la producción de especies reactivas de oxígeno y la peroxidación lipídica como un indicador de daño lipídico.

2. MARCO TEORICO

2.1 Producción *in vitro* de embriones

Con el nacimiento del primer bovino producido *in vitro* en 1981, la técnica de fertilización *in vitro*, comenzó a ser reconocida mundialmente, sin embargo, su estado del arte, hace que fuera una metodología aun restringida a la parte experimental, además de que sus condiciones de mercado en la década de los 80 y 90's restringía aun su aplicación comercial (Viana y Camargo, 2007). Con la introducción de la transferencia de embriones, se permitió el aumento no solo de la producción, sino de la posibilidad de distribución de este tipo de embriones. A nivel mundial, el crecimiento de la técnica ha sido evidente, como lo demuestran los datos reportados por la IETS (Thibier, 2001, 2007), en donde se observa que el número de transferencias de embriones frescos producidos *in vitro* que paso de 41,761 en el 2000 a 291,845 embriones en el 2006 (ver figura 1).

A nivel Suramericano, Brasil es uno de los países con mayor producción *in vitro* de embriones, lo que le ha permitido poder destacarse dentro del mercado mundial. Su crecimiento en estos últimos años ha sido igualmente significativo, pasando de 12.597 embriones producidos y transferidos en el 2000 a más de 196.000 en el 2006 (Viana y Camargo, 2007) (ver figura 1).

Argentina, por su parte, ha tenido una producción *in vitro* de embriones menor en comparación con otros países, debido a que la técnica aun no ha sido masificada de la misma manera. La baja proporción de ganado cebú que existe en la Argentina, hace que las tasas de recuperación ovocitaria en este tipo racial sean bajas y las inadecuadas condiciones de transporte y bajo número de receptoras, hacen que no haya sido favorable su producción en grandes cantidades (Cutaia y Bó, 2007). Por todas estas razones, es importante que se continúe haciendo investigación en este tópico, con el fin de superar ciertas limitaciones inherentes de la técnica, y conseguir optimizar un sistema de criopreservación que permita el fácil transporte y distribución de los

embriones, en países donde aun es difícil la diseminación de la técnica, así como el almacenamiento de los embriones excedentes, en países productores en donde el número de embriones supera el número de receptoras. (Cutaia y Bó, 2007; Viana y Camargo, 2007).

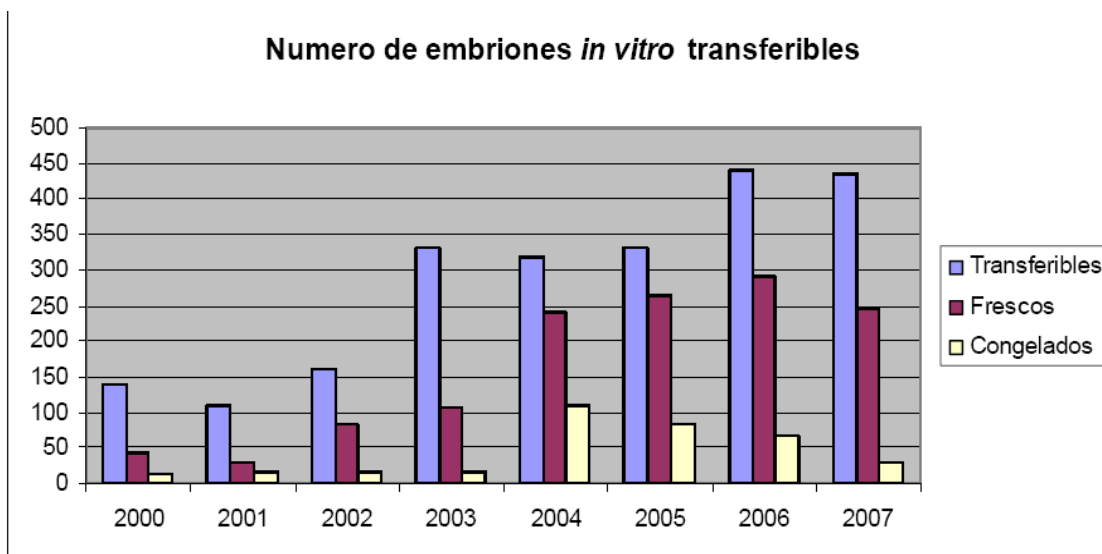


Figura 1. Total de embriones transferibles y transferidos frescos y congelados según el año de producción en el mundo (Rodríguez, 2009).

2.2 Criopreservación de embriones

La criopreservación de embriones se ha dado como consecuencia de un aumento en la productividad de animales de alto valor genético, así como la necesidad de conservación y comercialización de este material alrededor del mundo (Vajta, 2000b). El número de embriones producidos se ha incrementado de forma cuantiosa, creando la necesidad de almacenar los embriones excedentes por largos periodos de tiempo manteniendo su viabilidad. De igual forma, la posibilidad de generar bancos genéticos, ha permitido no solo el almacenamiento sino también facilitar el transporte y la programación de actividades para la utilización de dichas estructuras (Luster, 2004).

Uno de los principios más importantes de la criopreservación de embriones es poder permitir el almacenamiento de las estructuras a bajas temperaturas (-196°C), intentando mantener su integridad, a través de la remoción del máximo volumen posible de agua

antes de su congelamiento, evitando así la formación de hielo (Wowk, 2010; Saragusty y Arav, 2011). Dentro de los métodos más importantes de la criopreservación se encuentran, el método de congelación lenta y como alternativa posible, un método de congelación ultrarrápida denominado como la vitrificación. El método de congelación lenta es a hoy el más utilizado comercialmente (Vajta, 2000b). Su curva de lenta de congelación permite mantener el equilibrio entre los factores que pueden causar daño celular, como son la formación de cristales de hielo, la fractura de la zona pelúcida del embrión, el daño toxico y osmótico, así como las alteraciones de las organelas intracelulares y del citoesqueleto (Dobrinsky, 1996; Dobrinsky et al, 2000; Vajta y Kuwayama, 2006; Vanderzwalmen et al., 2002). Durante este procedimiento, los embriones son equilibrados dentro de bajas concentraciones de crioprotectores, en pajuelas de inseminación de 0.25 ml, con tasas de refrigeración entre los 0.3 a 1 °C/min, hasta alcanzar los -30 a -35°C, para posteriormente poder ser sumergidos en el nitrógeno líquido. Por su parte, la vitrificación es una metodología, definida como la solidificación de un líquido, producida no por la cristalización, sino por una extrema elevación de la viscosidad durante el enfriamiento (Fahy et al., 1984). Su curva de enfriamiento es más rápida (2500 °C/min) y necesita de la presencia de crioprotectores mas concentrados, que permitan la formación del llamado estado vítreo y disminuyan los daños químicos y mecánicos causados por el paso entre los puntos críticos de congelación (Dobrinsky, 1996; Sánchez et al, 2008). La formación del estado vítreo va evitar tales daños al promover la distribución iónica del líquido, impidiendo la formación de cristales de hielo (Rall y Fahy, 1985; Arav, 1992; Kasai, 2002).

A nivel mundial, la técnica de criopreservación de embriones mamíferos más utilizada es la congelación lenta o estándar, la cual hace uso de equipos programables que descienden la temperatura a una tasa constante; sin embargo, la implementación de técnicas avanzadas de criopreservación como la vitrificación, surge como una alternativa factible, ya que no se requieren de los equipos descritos anteriormente (Fahy, 1985).

En la técnica de congelación lenta o convencional, los principales objetivos son equilibrar las células con los crioprotectores y minimizar la formación de grandes

cristales de hielo (Mavrides y Morrol, 2002; Cuello et al, 2008). La congelación lenta busca mantener el balance entre la velocidad de enfriamiento (0.2-0.3°C/min), la velocidad de deshidratación, y la velocidad de formación de núcleos de hielo, de manera que se produzca la penetración de un crioprotector en la célula, produciéndose un equilibrio osmótico y disminuyendo la formación de cristales de hielo (Picton et al 2002; Vajta, 2000; Sánchez, et al, 2006).

La congelación rápida y ultrarrápida requieren la presencia de una alta concentración de crioprotectores intracelulares (5 a 7 M), por lo cual para reducir la toxicidad de las soluciones crioprotectoras, se realiza suplementación con azúcares y macromoléculas, que permite eliminar rápidamente el agua de las células y favorecen el ingreso de los crioprotectores intracelulares, y podrán ser sumergidas directamente en nitrógeno líquido a -196°C (congelación ultrarrápida o vitrificación) o en vapores de nitrógeno (congelación rápida) (Shaw y Jones, 2003).

2.2.1 Vitrificación vs congelamiento convencional

El congelamiento convencional, tiene una ventaja comparativa frente a los otros métodos de criopreservación, al ser una metodología que permite la utilización de bajas cantidades de crioprotectores y permite la transferencia directa de los embriones después del descongelamiento (Volkel y Hu, 1992). Sin embargo, su habilidad para prevenir la formación de hielo aun es limitada, y sus resultados en la criopreservación de embriones *in vitro* han sido variables (Massip et al, 1995; Hochi et al, 2001; Kaidi et al, 2001, Hasler, 2010), y menores en comparación a los datos obtenidos en embriones *in vivo* (Alvarenga et al, 2007; Dinnyes y Nedambale, 2009).

Con respecto a la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*, la respuesta de tasa de sobrevivencia después de la vitrificación, es mayor que la obtenida con metodologías de congelación lenta (Kaidi et al, 2001; Mezzalira et al, 2004; Alvarenga et al, 2007; Rodríguez, 2009). Mucci y colaboradores (2006) compararon la criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro*, por medio de las dos metodologías, encontrando un aumento en la viabilidad a las 72 horas post-

descongelamiento, de los embriones que fueron conservados por medio de la vitrificación (114/265; 43%) en comparación con los que fueron conservados bajo el método de curva lenta (33/275; 12%). Rodríguez y colaboradores (2011), comparo los efectos de dos métodos de criopreservación como lo son el congelamiento lento convencional y la vitrificación en las tasas de sobrevivencia de embriones producidos *in vivo* e *in vitro* Después de ser descongelados, las tasas de re-expansión (179/220, 81% vs 69/122, 56%) y las tasas de eclosión (159/220, 72% vs 53/122, 43%) fueron mayores ($P < 0.01$) para los embriones obtenidos *in vivo* vs los producidos *in vitro*, sin tener en cuenta el método de criopreservación. Los embriones producidos *in vivo* que fueron vitrificados tuvieron tasas de re-expansión similares (93/110, 85% vs 86/100, 86%) que aquellos que fueron congelados y así como en sus tasas de eclosión (78/110, 71% vs 81/100, 81%). Además, el método de vitrificación también mejoró las tasas de supervivencia de los embriones producidos *in vitro*, comparados con los embriones congelados ($P < 0.01$). Según Rodríguez y colaboradores (2011), el método de vitrificación mejora las tasas de supervivencia de los embriones *in vivo* y presenta resultados similares en embriones producidos *in vitro* en comparación con el sistema convencional de congelado. Sin embargo uno de factores que mas afecta la respuesta a la vitrificación, es el suplemento de suero durante el cultivo, el cual se asociado con la acumulación de lípidos y el cambio en el perfil de lípidos de los embriones (Abe y Hoshi, 2003). Estos cambios en el contenido de lípidos disminuyen la eficiencia de la respuesta de vitrificación, evaluada mediante la reexpansión del blastocite (Massip et al, 1995; Mucci et al., 2006; Pereira y Marques, 2008) y el mantenimiento de este (Rizos et al. 2003), inclusive la presencia de suero, altera la expresión génica (Niemann y Wrenzycki, 2000; Rizos et al. 2003) y disminuye la tasa de eclosión (Rizos et al. 2003; Mucci et al., 2006). Además, la vitrificación es una técnica que tiene otras ventajas comparativas frente al congelamiento tradicional, al utilizar procedimientos más simples, no necesitar de equipos costosos y requerir de poco tiempo para su realización (Baril et al. 2001).

2.2.2 Vitrificación

La vitrificación corresponde a una técnica de congelación ultrarrápida basada en el contacto directo entre la solución de vitrificación que contiene agentes crioprotectores y los oocitos o embriones (exposiciones cortas a altas concentraciones de crioprotectores de aproximadamente 4-6 mol/L), produciéndose una solidificación para formar un estado vítreo o similar a cristal, sin la formación de cristales de hielo durante el enfriamiento a tasas muy rápidas (tasa de congelación $>2000^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hasta $14000^{\circ}\text{C}/\text{min}$), permaneciendo en este estado durante todo el proceso de cambio de temperatura (Shaw y Jones, 2003; Albarracin, 2005; Mavrides y Morrol, 2002; Molina et al, 2004).

Debido a sus posibles efectos benéficos, esta metodología ha tomado gran importancia en la criopreservación no solo de embriones *in vitro*, sino también de oocitos y embriones producidos *in vivo*. Sin embargo, desde el primer procedimiento realizado con éxito en embriones mamíferos por Rall y Fahy en 1985, la vitrificación ha sufrido múltiples modificaciones, en el intento por simplificar sus procedimientos y mejorar las tasas de viabilidad de las estructuras. Inicialmente, varios de los estudios fueron enfocados, en la disminución los efectos tóxicos y osmóticos causados por las altas concentraciones de los crioprotectores (Kasai y Mukaida, 2004). La vitrificación al ser una técnica, que consiste en la criopreservación a través del aumento de la viscosidad de las soluciones crioprotectoras, necesita de concentraciones de crioprotectores mayor (4-8 M) a las utilizadas normalmente en el congelamiento (1-2 M) (Woods et al, 2004). Por lo tanto, la disminución de estos efectos deletéreos, va a ser obtenida a través de la utilización de crioprotectores menos tóxicos y el establecimiento de volúmenes, niveles de concentración menores, así como su temperatura y tiempos de exposición (Liebermann et al, 2003). El uso de soluciones crioprotectoras con bajo peso molecular es una de estas estrategias. Los crioprotectores al tener una mayor permeabilidad, van a permitir la reducción de los tiempo de exposición, y la minimización de los niveles de concentración, previniendo el daño osmótico causado en las células (Kasai y Mukaida, 2004). Entre los crioprotectores de bajo peso molecular, el más ampliamente utilizado es el etilenglicol (EG) (Massip, 2001). Sin embargo, varios experimentos sugieren que

crioprotectores como 1-2 propanediol (PROH), glicerol (GLY), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y sus posibles combinaciones con otros crioprotectores son igualmente candidatos para ser empleados en la vitrificación de embriones (Ishimori et al, 1992; Hubalek, 2003). De igual forma, la asociación de uno o más agentes crioprotectores, con características más estables, permitirá la utilización de soluciones más simples y la reducción de la toxicidad específica de los agentes. De acuerdo con algunos investigadores, la permeabilidad de la combinación de crioprotectores es mayor que la de sus componentes de forma individual (Vajta y Nagy, 2006).

La asociación más comúnmente utilizadas en vitrificación es la compuesta por EG y DMSO (Mezzalana *et al.*, 2004; Vajta y Nagy, 2006), sin embargo esta puede ser reemplazada por otro tipo de asociaciones de agentes crioprotectores, como el EG y PROH, obteniendo excelentes resultados en la vitrificación de embriones producidos *in vitro* y oocitos inmaduros (Vieira et al., 2008). La adición de crioprotectores no permeables, tales como disacáridos (sucrosa, trehalosa) o macromoléculas (Ficoll), polivinilalcohol (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), igualmente van a ayudar en la reducción de la toxicidad de los crioprotectores, ya que ayuda a disminuir los niveles de crioprotector dentro de las células (Liebermann, 2003; Kasai y Mukaida, 2004)

Por otro lado, los grandes volúmenes de crioprotectores también son limitantes de las tasas de enfriamiento. Los primeros contenedores utilizados con éxito en la vitrificación de oocitos y embriones, fueron las pajuelas de inseminación, las cuales utilizaban grandes volúmenes (>20 μL), que solo alcanzaban tasas de enfriamiento de $2500^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Palasz y Mapletof, 1996). Posteriormente, con la invención de contenedores de menor volumen (<5 μL), asociado con el contacto directo con el nitrógeno líquido, se consiguió aumentar las tasas de enfriamiento hasta casi los $30.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (He et al., 2008). La mayoría de estos contenedores además permitieron la disminución de las concentraciones de los crioprotectores, disminuyendo el daño tóxico y mecánico causado por la vitrificación. Entre los innumerables dispositivos creados están: la gota de tamaño mínimo (MDS) (Arav, 1992), los electron microscope grids (EM) (Martino et al, 1996), las pajillas abiertas y estiradas *open-pulled straw* (OPS) (Vajta et al, 1998),

los *cryoloop* (Lane et al., 1999; Kuwayama et al., 2005), el sistema de hemi-pajuela (Vanderzwalde et al., 2000), la superficie sólida de vitrificación (Dinnyes et al., 2000), los gel-loading tips (Tominaga y Hamada, 2001), las closed pulled straw (CPS) (Chen et al., 2001), *nylon mesh* (Matsumoto et al., 2001), *flexipet denuding pipette* (FDP) (Liebermann et al., 2002), las *superfinely open-pulled straw* (SOPS) (Isachenko et al., 2003), las micropipetas plásticas de diámetro fino (Cremades et al., 2004). Dentro de estos, el envase más usado comúnmente es el método de la OPS, la cual alcanza tasas de enfriamiento de más de 20,000 °C/min, disminuyendo los daños tóxicos y osmóticos en las células (Vajta et al., 1998). Sin embargo, posteriores modificaciones de este modelo consiguieron aumentar aun más las tasas de enfriamiento, al utilizar para su fabricación diferentes materiales distintos al plástico. El plástico debido a sus características físicas, tiene una baja conductividad de calor, que limita las tasas de congelamiento, por lo tanto el uso de otros materiales con mayor conductividad como el vidrio (Mezzalana et al., 1999), el metal (Bunn et al., 2006), o el cuarzo (He et al., 2008), permiten aumentar el intercambio de calor y las tasas de enfriamiento, alcanzando velocidades de casi 30.000°C/min. Varios autores, demostraron esta eficiencia, al alcanzar mayores tasas de congelamiento con micropipetas de vidrio (GMP) en comparación con las OPS, y mayores tasas de sobrevivencia post-vitrificación, debido a una mayor conductividad y la utilización de un menor volumen de crioprotectores (Kong et al. 2000; Cho et al., 2002). Por último, otra de las estrategias para aumentar la velocidad de congelamiento, ha sido la reducción de temperatura del nitrógeno líquido. El uso de nitrógeno súper-congelado, reduce el punto de ebullición, mediante la estabilización a través de la presión negativa, reduciendo el efecto aislante del vapor del nitrógeno, permitiendo una mayor eficiencia en la transferencia de calor entre las muestras y el nitrógeno líquido (Vieira et al., 2008). De esta forma, el nitrógeno líquido va a alcanzar temperaturas de -210°C, y permitirá alcanzar curvas de congelamiento más rápidas, que reduzcan la posibilidad de desvitrificación y recristalización de las muestras durante el descongelamiento (Arav et al., 2000; Santos et al., 2006).

La tasa de congelación es uno de los principales determinantes de la supervivencia celular durante la criopreservación. La congelación muy lenta puede causar la muerte celular por su exposición a soluciones concentradas, mientras la congelación rápida

puede causar muerte celular por formación de cristales de hielo (Luster, S, 2006) En la vitrificación de oocitos, algunos autores reportan que las tasas de supervivencia para bovinos (Lazar, 2000) y humanos (Picton et al, 2002) son cercanas al 70%. Por lo tanto, se ha demostrado que el método de vitrificación es superior al procedimiento de congelación lenta convencional para criopreservación de embriones de bovinos, humanos y otras especies animales (Otoi et al, 1998; Molina et al, 2004). Según Massip (2003), la vitrificación especialmente usando tasas muy altas de enfriamiento en volúmenes extremadamente pequeños de crioprotectores, es vista como el método más apropiado, para lo cual se han desarrollado nuevos métodos de vitrificación que pueden maximizar la tasa de congelación, manteniendo la viabilidad de las células, previniendo el estrés mecánico, y facilitando la manipulación durante la criopreservación y la recolección (Tan, 2004). Sin embargo los protocolos de vitrificación pueden causar un choque osmótico severo y puede comprometer su sobrevivencia post-descongelación y potencial de desarrollo (Picton et al., 2002).

Para la vitrificación el tamaño de la muestra debe ser lo más pequeña posible para aumentar la velocidad de congelación. Para dicho fin se han descrito diversos soportes físicos para la vitrificación como pajillas tradicionales para 0,25 ml, *open pulled straw* (ver figura 2), *closed pulled straw*, *flexipet-denuding pipette*, microgotas, gradillas de cobre de microscopia electrónica, sistema *hemistraw*, *nylon mesh*, y *cryoloops*.

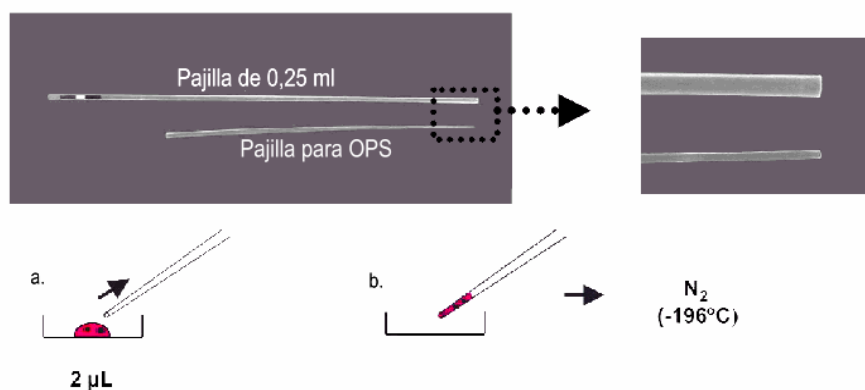


Figura 2. Pajilla abierta y estirada (*Open pulled straw*, OPS), pajilla de 0,25ml. a. Gota de 2 µl de crioprotector con los oocitos. b. Montaje de la gota por capilaridad en la pajilla y su paso directo al nitrógeno líquido. Adaptado de Guignot (2005).

El uso de la técnica *open pulled straw* OPS (pajilla abierta y estirada), ha permitido aumentar la velocidad de los cambios de temperatura, lo cual ofrece ciertas ventajas para la congelación, como son la disminución de los tiempos de exposición a los crioprotectores utilizados, con los consecuentes menores efectos osmóticos y tóxicos, lo que produce menores daños por enfriamiento (Silva y Berland, 2004).

Los índices de supervivencia de embriones vitrificados son todavía muy bajos en la especie bovina, lo que podría ser debido al daño de las membranas plasmáticas o la comunicación intracelular, perjudicando así su posterior implantación. (Carvalho, 2006)

Tabla 1 Tasas de reexpansión de embriones, posterior a su devitrificación

Grupo	Tasa de Reexpansión (%)
Grupo Control (sin vitrificar) con Citocalasina B	17/57 (28.8%) ^a
Grupo Control (sin vitrificar) sin Citocalasina B	38/70 (54.3%) ^a
Grupo 4 (EG + DMSO) con Citocalasina B	0/57 (0%) ^d
Grupo 4 (EG + DMSO) sin Citocalasina B	0/61 (0%) ^d
Grupo 5 (EG + DMF) con Citocalasina B	0/61 (0%) ^d
Grupo 5 (EG + DMF) sin Citocalasina B	6/57 (10.5%) ^b
Grupo 6 (DMF + DMSO) con Citocalasina B	0/64 (0%) ^d
Grupo 6 (DMF + DMSO) sin Citocalasina B	4/54 (7.4%) ^c

a, b No hay diferencia estadística significativa ($p > 0.05$)

Fuente: Carvalho, 2006

La criopreservación de embriones producidos *in vitro*, es una alternativa experimental usada para conservar un alto número de embriones producidos en condiciones de laboratorio. Los embriones producidos *in vitro* poseen muchas características que los

hacen sensibles a daños generados por la criopreservación, la presencia de zona pelúcida y gránulos corticales periféricos (Amorin et al, 2003). Estos trabajos indican que la congelación ultrarrápida o vitrificación puede ser una técnica más práctica que el procedimiento de congelación lenta convencional, y además posee la ventaja de no requerir equipos de congelación costosos. (Massip, 2003; Albarracin, 2005)

Carvalho (2006), realizó un estudio con el objetivo de evaluar los efectos de la vitrificación de embriones producidos *in vitro* usando etilenglicol EG, dimetilsulfoxido DMSO y dimetilformamida DMF en la morfología de embriones. Así: solución 1 20% EG + 20% DMSO + 0,5M Sacarosa; solución 2 20% DMF + 20% EG + 0,5M Sacarosa y solución 3 20% DF + 20% DMSO + 0,5M Sacarosa Encontrando que los únicos grupos de embriones vitrificados que mostraron reexpansión, fueron aquellos que utilizaron la DMF en la composición de la solución crioprotectora a una concentración de 20%, indicando que esta sustancia puede tener un efecto benéfico en la vitrificación de embriones bovinos, el autor encontró que con la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro* con asociaciones de crioprotectores que contengan dimetilformamida se logran las mejores tasas de viabilidad posdevitrificación.

2.2.3 Devitrificación

Los protocolos de desvitrificación deben tratar de disminuir la probabilidad de recristalización mediante una adecuada transferencia térmica. El método de desvitrificación más común para oocitos es un método rápido y directo (Mucci et al, 2006; Moore, 2007). Durante la descongelación el rápido influjo de agua al interior de la célula, pueden causar un choque osmótico, cuya sensibilidad por la célula es dependiente de la permeabilidad de la célula al agua y los solutos, y que puede ser reducido por el uso de un buffer osmótico, no tóxico e impermeable como la sucrosa. La tasa de calentamiento óptima depende de los crioprotectores y su concentración, al igual que la tasa de congelación utilizada (Fahy et al, 1984).

Para descongelar una muestra vitrificada, se sumerge el soporte de vitrificación en un medio a temperatura fisiológica (37,5 - 39°C), obteniendo velocidades de calentamiento

entre 3000 a 8000 °C/minuto, dependiendo del soporte utilizado. Los embriones son puestos en una solución para calentamiento entre 20°C a 37°C, para posteriormente rehidratarlos y remover los crioprotectores utilizados (Mucci et al, 2006)

2.3 La dimetilformamida como crioprotector

La N,N-dimetilformamida (o dimetilformida) (DMF) es un compuesto orgánico de fórmula $(\text{CH}_3)_2\text{-N-CHO}$, de características incoloro, completamente soluble en agua, soluble en alcohol etílico, acetona, eter y benceno (Winkler® ficha de seguridad química). La DMF es utilizada como disolvente para reacciones químicas. La dimetilformamida pura es inodora, mientras que si está degradada presenta un cierto olor a pescado debido a la impureza de la dimetilamina. Su nombre proviene del hecho de ser un derivado de la formamida, la amina del ácido fórmico (Weissermel, 2006)

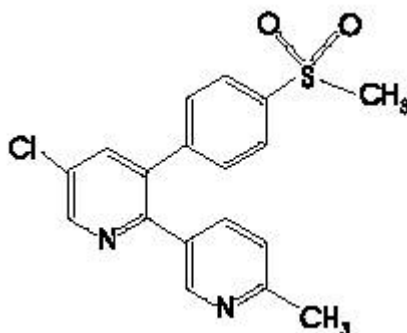


Figura 3. Estructura química de la Dimetilformamida DMF (Baudot y Boutron, 1998)

La dimetilformamida es un disolvente polar con un alto punto de ebullición. Facilita las reacciones que siguen mecanismos polares, como es el caso de las reacciones $\text{S}_{\text{N}}2$. La dimetilformamida puede ser sintetizada a partir de formiato de metilo y dimetilamina o mediante reacciones con dimetilamina y monóxido de carbono. No es estable en presencia de bases fuertes como el hidróxido sódico o ácidos fuertes como el ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y se hidroliza en ácido fórmico y dimetilamina, especialmente a altas temperaturas. (Weissermel, 2006)

Con respecto a la criopreservación, la inclusión de DMF en las combinaciones de crioprotectores, mantiene la integridad estructural de membranas y organelas, después de la descongelación y la rehidratación de los embriones (Kennedy, 1986, Mahmoudzadeh et al, 1994; Mapletoft, 2008).

La respuesta de los embriones en términos de sobrevivencia a la criopreservación fue evaluada por Huang et al (2011), en cuyo experimento sometió embriones de crustáceo a la exposición de varios crioprotectores tales como el metanol (MeOH), propilenglicol (PG), dimetilsulfoxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF), en tres concentraciones 10, 15 y 20%, la tolerancia a la toxicidad vario de acuerdo al estado de desarrollo embrionario y a la concentración del crioprotector. PG y DMF fueron menos tóxicos en comparación con el DMSO y el metanol.

Augustine-Rauch et al (2004) evaluó los crioprotectores etanol, dimetilsulfoxido y dimetilformamida y su experimento mostro que usando el etanol el 80% de los embriones sometidos a la criopreservación producía significativas malformaciones en un 80% de ellos; los embriones tratados con DMF no presentan malformaciones y el DMSO mostro una significativa toxicidad en los embriones.

2.4 Criotolerancia

La capacidad de los embriones para tolerar la criopreservación ha sido utilizada como un indicador de calidad y viabilidad embrionaria (Kaidi et al, 1998). Actualmente la congelación lenta y la vitrificación son utilizadas para criopreservar embriones bovinos, de las cuales la congelación lenta es la más utilizada, debido a las ventajas como el uso de bajas concentraciones de crioprotectores y permite una transferencia directa del embrión post-descongelamiento, sin embargo la tasa de supervivencia post-descongelamiento de los embriones es reducida (Kasai, 1996).

En el proceso de post-criopreservación (devitrificación), las células del trofoectodermo cumplen una función muy importante en la reexpansión y mantenimiento del blastocele, cambios generados por el transporte de agua entre el blastocele y el medio que rodea el

embrión, debido a los cambios osmóticos después de la exposición a las soluciones de criopreservación. La integridad de la membrana celular, el número de células vivas, la reexpansión y el mantenimiento del blastocele, son criterios para la evaluación de la viabilidad y calidad embrionaria (Mucci et al, 2006).

Es necesario incluir los agentes crioprotectores en la solución de vitrificación, ya que previenen el daño celular tanto en el proceso de enfriamiento como en el de calentamiento. En general, cuando los embriones son expuestos a un crioprotector, estos inicialmente se contraen por pérdida de agua, es decir, se deshidratan debido a la hiperosmolaridad inicial de la solución extracelular, y además porque los embriones son más permeables al agua que a los crioprotectores (Schneider and Mazur, 1984; Ali and Shelton, 1993).

Cuando la célula es transferida de una solución isotónica a una hipertónica, ella responde osmóticamente perdiendo agua para mantener el equilibrio entre la solución intracelular y la extracelular. Los dos estados de la célula (hidratada y medio deshidratada) pueden determinar en gran parte el destino de la célula cuando es enfriada y congelada a temperaturas bajo cero (Roa et al, 1998).

Es claro que la criopreservación de embriones *in vitro* está ligada a la calidad en el proceso de producción. Por tanto, para poder generar métodos más eficientes de criopreservación se va a necesitar no solo el desarrollo de nuevas tecnologías sino igualmente de modificaciones dentro del proceso de producción que permitan una mayor sobrevivencia de los embriones al momento de la vitrificación. La modificación de los medios de cultivo, puede ser una de las opciones. El desarrollo de nuevos sistemas de cultivo, que mejoren considerablemente la calidad embrionaria y por tanto la criotolerancia de los embriones, al punto de que metodologías como el sistema de congelamiento convencional, pueden ser igualmente utilizadas con éxito en la criopreservación de este tipo de embriones (Nedambale et al. 2006; Guerra et al 2011). Varios estudios han demostrado que la producción de embriones *in vitro* en cierto tipo de medios de cultivo (Leibo y Loskutoff, 1993; Mahmoudzadeh et al., 1994; Massip et al., 1995) o a través del co-cultivo con células de la granulosa o células vero (Leibo y

Loskutoff, 1993; Desai et al., 2000) puede aumentar las tasas de sobrevivencia de los embriones postvitrificación.

El suero y la composición de lípidos en los sistemas de cultivo pueden cumplir un papel importante de la criotolerancia de los embriones. Se ha comprobado que la presencia del suero en el suplemento de los medios de cultivo puede influenciar la composición química de los embriones (Saha y Suzuki 1997) y su sensibilidad a la criopreservación (Dinnyes et al. 1995). Los medios de cultivo libres de suero, permiten el desarrollo y la eclosión de casi el 100% de los embriones producidos *in vivo* después de la vitrificación (Mapletoft, 2008), así como la reducción del contenido citoplasmático de lípidos en los embriones con etosulfato de fenazina (PES) (Seidel, 2006), la adición de la hialuronato (Palasz et al., 2008) o ácido linoleico (Laowtammathron *et al.* 2005; Pereira y Marques, 2008) aumentan la criotolerancia de los embriones bovinos *in vitro* cultivados en medios de cultivo libres de suero. Por otro lado, se puede reducir igualmente el alto nivel de lípidos que se encuentra en los embriones producidos *in vitro*, por medio de la remoción de lípidos por centrifugación o a través de la micro-manipulación, aumentando así las tasas de sobrevivencia de los embriones criopreservados (Sánchez, et al., 2008).

Por otro lado, la formación de radicales libres durante la criopreservación puede causar daño celular y disminuir la viabilidad de los embriones. Razón por la cual, la adición de Etilen Diamino Tetraacético EDTA (0.1mM) y/o glutatión (GSH; 1 mM) en el cultivo antes de la vitrificación pueden llegar a mejorar el desarrollo de los embriones, al disminuir la oxidación de las membranas celulares insaturadas de lípidos, promoviendo su integridad celular (Abe et al, 1999). Además, la adición de agentes como el EDTA y el β-mercaptoetanol, pueden llegar a aumentar sustancialmente las tasas de sobrevivencia aun en ambientes con bajos niveles de oxígeno, al proteger al embrión de los radicales libres y la autoperoxidación de lípidos (Nedambale et al., 2006).

Otras de las estrategias de optimización del proceso de vitrificación, pueden realizarse por medio de la modificación de las características propias del embrión antes de ser expuesta al proceso de criopreservación. Por ejemplo, la inyección de trehalosa en

oocitos, aumenta la protección de las estructuras y disminuye los efectos deletéreos debido a la toxicidad de los crioprotectores (Eroglu et al., 2003), la reducción artificial del fluido blastocélico, puede reducir el shock osmótico, los problemas de permeabilidad y la formación de cristales de hielo (Vanderzwalmen et al., 2002; Son et al., 2003; Chen et al., 2005) y la estabilización del citoesqueleto con la adición de citocalasina B, que reduce la despolimerización de los microfilamentos y microtúbulos, mejorando las tasas de sobrevivencia de los oocitos y embriones criopreservados (Dobrinsky *et al.*, 2000). Por lo tanto, estas metodologías serán probablemente útiles, al minimizar ciertas anomalías celulares propias de los embriones producidos *in vitro* y hacer con que sean cada vez menos sensibles a la vitrificación.

2.5 Peroxidación lipídica

2.5.1 Proceso de la peroxidación lipídica

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son las moléculas biológicas más susceptibles al estrés oxidativo y su degradación se denomina peroxidación lipídica. Esta peroxidación lipídica es el efecto más importante de los radicales libres sobre la célula, ya que la destrucción de los PUFA de la membrana junto con la formación de puentes disulfuro en las cadenas proteicas y la ruptura de estas, provoca desmoronamiento de la estructura de la membrana que conduce a una pérdida de la permeabilidad y, posteriormente a la muerte celular. Por lo tanto la peroxidación lipídica puede ser utilizada en ocasiones como indicador del estrés oxidativo y biomarcador de contaminación ambiental (Alvarez y Storey, 1992; Neild et al, 2005). Tras la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de las membranas biológicas se generan entre otros malonildialdehido (MDA) y 4-hidroxiacetaldehído (4-HNE), como productos finales de la reacción. Gracias a que su determinación, se puede cuantificar la peroxidación lipídica y por lo tanto es considerado uno de los métodos para evaluar el estrés oxidativo en los organismos (ver figura 4).

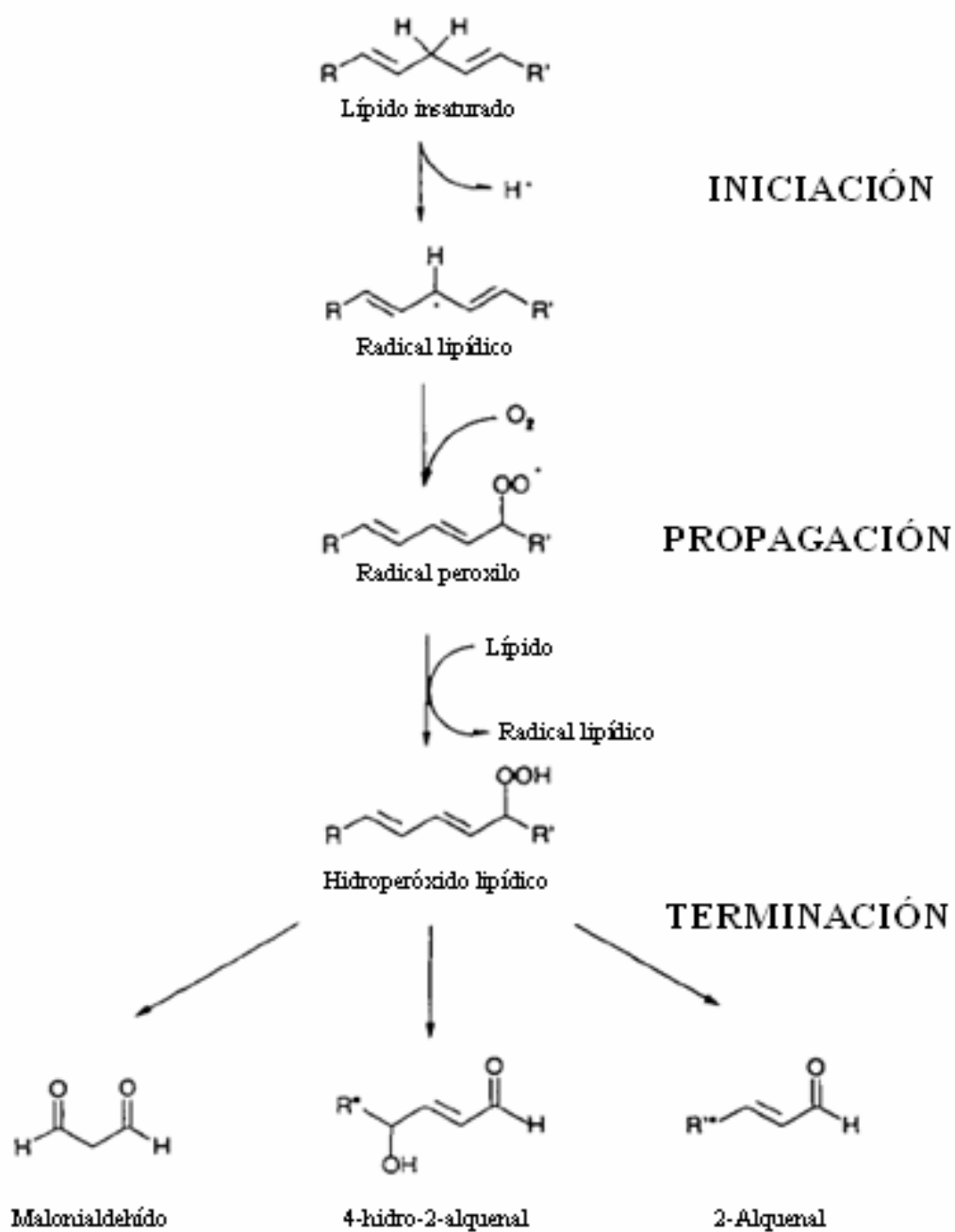


Figura 4: Formación de las sustancias genotóxicas, durante la peroxidación lipídica, Tomado de Burchan, P, 1998.

2.5.2 Cómo medir el daño oxidativo

La peroxidación lipídica es un proceso complejo, en el cual los ácidos grasos no saturados en los fosfolípidos de las membranas celulares son atacados por radicales que provocan la abstracción de un hidrógeno, formándose hidroperóxidos que son de difícil medición por degradarse rápidamente. No obstante, la lipoperoxidación constituye el patrón de oro cuando se trata de probar la función de los radicales libres en algún tipo de daño celular (Burchan, 1998).

2.5.3 Determinación de sustancias reactivas de oxígeno con el ácido cis-parinárico (CAP).

El ácido cis-Parinárico es un ácido graso fluorescente poliinsaturado de 18 carbonos con una estructura lineal polienica que consiste en 4 enlaces conjugados de π -electrones. La fluorescencia del CAP se pierde irreversiblemente en la oxidación, este compuesto se ha usado para evaluar la peroxidación de lípidos y también para la actividad antioxidante de compuestos lipofílicos. Para Drummen y colaboradores (2004), el uso de CAP como una sonda de membrana es adecuado, es sensible y reproducible para detectar las etapas iniciales de la peroxidación lipídica en células vivas con otras ventajas:

1. Se encuentra en una conformación muy parecida a los restos endógenos de los ácidos grasos con una movilidad que es comparable a los fosfolípidos endógenos.
2. Las propiedades fluorescentes y peroxidativas se combinan en el sistema conjugado de los enlaces insaturados de carbono-carbono.
3. Sus propiedades fluorescentes se pierden instantáneamente en la peroxidación.
4. No contiene un grupo reportero de masas y por lo tanto no perturba la membrana lipídica.
5. Puede ser integrado metabólicamente a los fosfolípidos de la membrana de células cultivadas.

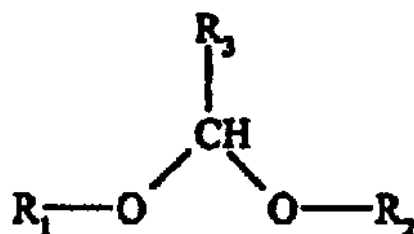


Figura 5: Estructura química del Cis Acido Parinámico CAP, Drummen, 2004

Esta sonda ha sido utilizada extensivamente para medir la peroxidación lipídica en lipoproteínas, eritrocitos, partículas sub mitocondriales, retículo sarcoplasmático, células del musculo liso aórtico de la rata, membrana del cristalino, líneas de células de rápida división y macrófagos (Gómez et al 2005).

2.5.4 Usos de la 2,7-diclorodihidrofluorescina diacetato (H₂DCFDA).

Se usa para detectar varias EROs (especies reactivas de oxígeno) y ERN (especies reactivas al nitrógeno) en medios biológicos (Gomes et al., 2005). Las esterasas celulares hidrolizan primero el CDFH-DA a DCFH que luego es oxidado por especies reactivas y originan DCF, un componente fluorescente. El DCFH es soluble en lípidos y reacciona con radicales en el compartimento lipofílico al igual que en la fase acuosa. La reacción del DCFH con radicales acuosos es suprimida por antioxidantes acuosos, mientras que con los radicales lipofílicos no. La utilidad de esta sonda para detectar hidroperóxidos lípidos ha sido referida por Cathcart y colaboradores (2006).

Debido la disponibilidad comercial de crioprotectores permeables que tiene una reconocida capacidad protectora a las temperaturas superfrías en tejidos, órganos y embriones y a la posibilidad de evaluarlas en sistemas de producción *in vitro* de embriones sometidos a procesos de vitrificación, se propone evaluar el efecto del

crioprotector dimetilformamida (DMF) en combinación con el dimetilsulfoxido (DMSO) sobre diferentes parámetros de calidad del embrión, como son: la morfología, el porcentaje de reexpansión y el mantenimiento de la misma a las 6 y 18 horas, el nivel de producción de radicales libres y la cuantificación de la peroxidación lipídica de los embriones posdevitrificados.



3. OBJETIVOS DEL PROYECTO

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del crioprotector Dimetilformamida (DMF) sobre la criotolerancia de embriones bovinos producidos *in vitro*

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Evaluar dos concentraciones del crioprotector Dimetilformamida (DMF) y su efecto en la morfología de embriones bovinos posdevitrificación.

Determinar el mantenimiento de reexpansión de los embriones bovinos posdevitrificación a las 6 y 18 horas.

Cuantificar los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el medio de cultivo de embriones devitrificados.

Cuantificar la peroxidación lipídica en los embriones bovinos producidos *in vitro* sometidos al proceso de vitrificación.

Determinar los niveles de especies reactivas de oxígeno en embriones bovinos posdevitrificación.

4. METODOLOGÍA

En este proyecto fueron evaluados dos concentraciones del crioprotector Dimetilformamida (DMF), como alternativa para la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro* e igualmente se identificaran sus efectos sobre la calidad de los embriones bovino producidos *in vitro* devitrificados, teniendo en cuenta parámetros de morfología, mantenimiento de la reexpansión, la producción de radicales libres y la peroxidación lipídica.

En los experimentos iniciales se evaluó el uso de la dimetilformamida (DMF) en la mezcla de los crioprotectores utilizados para la técnica de vitrificación y su efecto sobre la sobrevivencia embrionaria, posterior a la vitrificación, se observó como criterio de viabilidad y criotolerancia, la morfología del embrión y el porcentaje de reexpansión de los embriones devitrificados y su posterior evaluación de los parámetros de calidad adicionales seleccionados.

Seguidamente, fueron evaluadas la peroxidación lipídica mediante la presencia de malondialdehído (MDA), el cual puede ser detectado y cuantificado al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) y fue evaluado en los medios de cultivo en la presencia de embriones y sin la presencia de ellos. Posteriormente se evaluó la diclorofluoresceína diacetato en el medio de cultivo de embriones por su sensibilidad a las EROs y finalmente la fluorescencia del fluorocromo análogo de ácido graso, cis ácido parinárico (CAP), el cual se intercala en la membrana celular y es susceptible a EROS, lo que conduce a la pérdida de fluorescencia.

El diseño experimental de esta propuesta de investigación fue definido como un diseño de bloques completo al azar. Las unidades experimentales se distribuyeron en bloques (día de trabajo), y el número de unidades experimentales dentro del bloque es igual al número de tratamiento que van a ser evaluados y son distribuidas al azar.

4.1 Localización

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín y la consecución del material biológico para la obtención de los complejos cúmulo oocito (CCOs), se gestionó con el ingreso de personal a la planta de beneficio bovino de los municipios de Medellín y Girardota.

4.2 Procesamiento del material de estudio

Los ovarios bovinos obtenidos en las plantas de beneficio, se depositaron en solución de tampón fosfato salino (PBS) estéril, previamente preparada en el laboratorio a 37°C, para luego ser transportados (entre 15 minutos y una hora aproximadamente) hacia el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional Sede Medellín para su procesamiento.

En el laboratorio, bajo condiciones asépticas se lavaron los ovarios tres veces con PBS a 37°C para retirar material contaminante, sangre y detritus tisular. Luego con aguja N°18 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. Luego se procedió a descartar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 1mL de medio de lavado (TCM-199 con sales de Hank's suplementado con 275 microgramos/mL de ácido pirúvico, 29.2 microgramos/mL de glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 microgramos/mL de estreptomycin, 0.25 microgramos/mL de anfotericina B (Tsafriri et al., 1996), y se depositó luego en caja de Petri estéril de 60 x 15 mm. Bajo visión con estereomicroscopio se seleccionaron los complejos CCOs de buena calidad según los criterios previamente establecidos (Lindner and Wright en 1983). Los CCOs seleccionados fueron lavados tres veces en medio TCM 199 con sales de Hank suplementado y en grupos de diez CCOs se cultivaron a 38.5 °C en gotas de 50

microlitros de medio de maduración, cubiertas con aceite mineral en cajas de petri medianas 60 x 10 mm

Los CCOs se clasificaron de acuerdo con la cantidad y calidad de capas de células del cumulus y la apariencia de su ooplasma según los parámetros establecidos para tal efecto por Lindner and Wright en 1983. (Tabla 1). De estas categorías en general se considera que solamente los oocitos tipo 1 y 2 poseen un elevado potencial para desarrollarse a embriones por FIV.

Tabla 2. Categorías de complejos cúmulo oocito para procesos de FIV

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 (Denudados)	Irregular con zonas oscuras
4 Malo	Células expandidas	Irregular con zonas oscuras

Fuente: Lindner and Wright en 1983

4.3 Maduración *in vitro* de oocitos

Los CCOs fueron incubados por 24 horas en grupos de 10 por gota de 50 microlitros de medio de maduración, suplementado al 3% de suero fetal bovino SFB, gonadotropinas (rhLH 5 µg/ml, pFSH 1 µg /ml). El medio de maduración M199, suplementado con 0.33 mM de piruvato de sodio, 1µg/mL de Estradiol, 5% de suero fetal bovino, 6 mg/ml de

albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (BSA FAF, Sigma A6003), 10 microlitros/ml de solución antibiótica (100X ICN 1674046, penicilina 10.000UI/ml; estreptomicina 10mg/ml; anfotericina B 25mg/ml). Las gotas fueron cubiertas con aceite mineral (Sigma M8410) y preincubadas bajo condiciones de maduración por un mínimo de 3 h (38.5°C, 5% CO₂ en aire con 100% de humedad).

4.4 Fertilización *in vitro*

Cumplidas las 24 horas de maduración *in vitro*, se descongeló una pajilla de semen con un volumen de 0.5 ml, proveniente del mismo ejemplar cuya procedencia es el laboratorio de procesamiento de semen San Pablo de la Universidad Nacional de Colombia, el cual fue descongelado en un baño maría a 37°C por 60 segundos, posteriormente la pajilla fue secada y su contenido fue vertido en un eppendorf, se tomaron 10 µl de semen, los cuales se depositaron en la cámara de Makler, para estimar la concentración y la movilidad de la muestra. Se agregó al tubo eppendorf, que contiene el semen 1.000 µl de medio SP TALP (Sperm Tyrode albumin lactate pyruvate) y se procedió a centrifugarlo a 300 g x 10 minutos; con el fin de lavar los diluyentes y el crioprotector usado, terminada la centrifugación se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado, al cual se le agregaron 500 µl de medio FERT, realizando cuidadosamente un gradiente inclinado *Swin up*, el cual se incubó por 45 minutos, lo que permitió seleccionar la proporción de espermatozoides viables y móviles. Pasados los 45 minutos se tomó con micropipeta la parte superior del gradiente aproximadamente 250 µl. Se calculó una solución de medio FERT con una concentración espermática de 2×10^6 espermatozoides/ml, añadiendo 2 µl de PHE y Heparina suplementado con 2 mM de penicilamina, 100 UI/ml de penicilina, 100 microgramos/ml de estreptomicina y 0.25 microgramos/ml de anfotericina B (Eckert and Nieman, 1995; Dode, et al., 2000). Se sirvieron gotas de 50 µl en caja de petri y estas se cubrieron con aceite mineral, para luego llevar la caja de petri a la incubadora por 20 minutos, pasados los 20 minutos se transfirieron los oocitos a las respectivas gotas y se incubaron durante 18-20 horas. Las condiciones de fertilización fueron de 38.5°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Al finalizar el tiempo de fertilización,

los presuntos cigotos fueron transferidos a medio de desarrollo. Previo a este procedimiento los oocitos fueron lavados y desnudados por pipeteo mecánico.

4.5 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 50µl de medio de cultivo EVOLVE, suplementado con 5% de suero fetal bovino, 6 mg/ml de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (BSA-FAF), 0.33mM de piruvato de sodio y 10 microlitros/ml de solución antibiótica (100X, penicilina, 10.000UI/ml; estreptomina microgramos/ml; anfotericina B 25mg/ml). Después de las 72 horas de cultivo, se realizó un recambio del medio del 50% y se continuó el cultivo por 96 horas. Las condiciones de cultivo fueron 38.5°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa (Gandhi et al., 2000).

A los siete días de cultivo, los blastocistos obtenidos y posterior a su clasificación según los criterios de la sociedad de transferencia de embriones IETS (De Cosio, 2008) se sometieron al proceso de vitrificación en cada grupo de estudio. Siendo los criterios de selección los siguientes descritos por Camargo (EMBRAPA, 2008)

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 a partir de este estadio (figura 6)

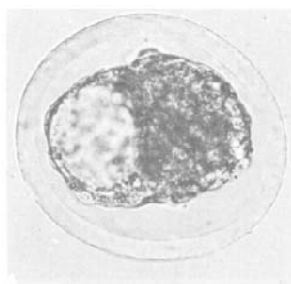


Figura 6. Blastocisto inicial

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. (Figura 7)

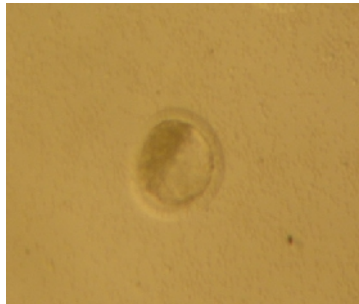


Figura 7. Blastocisto

Blastocisto Expandido (BX): El diámetro del embrión aumenta considerablemente y se adelgaza la zona pelucida, ocupando el 100% del espacio paravitelino. (Figura 8)

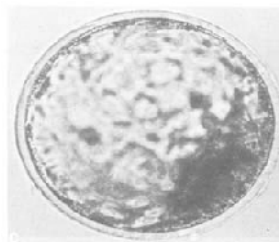


Figura 8. Blastocisto expandido

4.6 Vitricación y criotolerancia

4.6.1 Vitricación de embriones

Los embriones en los estadios de blastocisto temprano, blastocisto y blastocisto expandido descritos anteriormente, fueron vitricados como se describe a continuaci3n:

Grupo 1 (Control), los blastocistos fueron incubados por 30 segundos en la soluci3n A (10% etilenglicol (EG) + 10% de dimetilsulfoxido (DMSO), preparadas en medio TCM-199 Hepes (Sigma M7528) suplementado con 20% de Suero fetal bovino, a una temperatura de 38.5°C. Luego fueron transferidos durante 25 segundos a una soluci3n B 20% de etilenglicol + 20% de dimetilsulfoxido y 0.5M de sucrosa, preparadas en medio TCM 199 Hepes suplementado con 20% de Suero fetal. (Carvalho, 2006)

Grupo 2, fue dividido as3:

Tratamiento 1, los blastocistos fueron incubados por 30 segundos en la soluci3n A (7,5% dimetilformamida (DMF) + 7,5% de dimetilsulfoxido (DMSO), preparadas en medio TCM-199 Hepes (Sigma M7528) suplementado con 20% de Suero fetal bovino a una temperatura de 38.5°C. Luego fueron transferidos durante 25 segundos a una soluci3n B (15% de dimetilformamida (DMF) + 15% de dimetilsulfoxido (DMSO) y 0.5M de sucrosa, preparadas en medio TCM 199 Hepes suplementado con 20% de Suero fetal bovino.

Tratamiento 2, los blastocistos fueron incubados por 30 segundos en la soluci3n A (10% dimetilformamida (DMF) + 10% dimetilsulfoxido (DMSO), preparadas en medio TCM-199 Hepes (Sigma M7528) suplementado con 20% de Suero fetal bovino) a una temperatura de 38.5°C. Luego fueron transferidos durante 25 segundos a una soluci3n B (20% de dimetilformamida (DMF), 20% de dimetilsulfoxido (DMSO) y 0.5M de sucrosa, preparadas en medio TCM 199 Hepes suplementado con 20% de Suero fetal.

Las Pajillas plásticas de 0.25 ml (Fench mini straws) fueron modificadas de acuerdo a lo descrito por Vajta, 2000, con el siguiente procedimiento: el tercio central de las pajillas fue apoyado y calentado por 30 segundos sobre la esquina de una platina térmica a 90°C, hasta el evidente reblandecimiento del plástico. Una vez logrado esto ambos extremos fueron traccionados en un plano horizontal hasta lograr en la porción central la reducción del diámetro interno y externo a la mitad de la medida original, y consecuentemente la disminución del grosor de la pared. Luego, se cortaron las pajillas en la sección más delgada con un bisturí, quedando la pajilla convertida en una OPS (*open pulled straw*), para posteriormente ser esterilizadas utilizando luz ultravioleta y almacenadas hasta su uso. El volumen de solución crioprotectora que contendrá el extremo delgado de la pajuela será de 2µl, correspondiente al volumen de la gota desde la cual el embrión será cargado por capilaridad.

Para los grupos 1 y 2, en un volumen de 2 µl fueron cargados 2 o 3 embriones por pajilla OPS (*open pulled straw*), el extremo más delgado de cada pajilla OPS, se cargo por capilaridad al tocar la superficie de una gota de la solución B más los embriones, lo cual permite una dilución inmediata de los crioprotectores durante la descongelación, con lo que se reduce el efecto tóxico y osmótico de la solución (Vajta et al, 1997b; Vajta et al, 1998a). Las pajillas fueron sumergidas en un criovial y llevadas directamente al nitrógeno líquido dentro de los siguientes 25 segundos, para ser mantenidas allí hasta su desvitrificación (Vajta et al, 1998).

Grupo 3 Embriones producidos *in vitro* no vitrificados

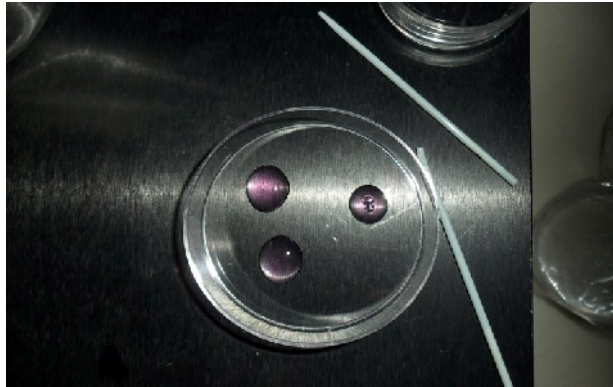


Figura 9. Gotas de mezcla de los crioprotectores y pajillas abiertas y estiradas (OPS) usadas para la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*

4.6.2 Devitrificación de embriones

Para la devitrificación cada pajilla fue retirada del nitrógeno líquido, para luego sumergir su extremo más delgado en 1.2 ml de medio TCM-199 Hepes con 20% de SFB y 0.25 M de sucrosa por 5 minutos, los embriones fueron expelidos en el medio a 38.5°C. Después los embriones se transfirieron a gotas de medio TCM-199 Hepes con 20% de SFB y 0.15 M de sucrosa por 5 minutos (Pereira et al., 2005; Vajta et al., 1998). Finalmente los embriones se transfirieron a medio EVOLVE con 5% de suero fetal bovino, 6 mg/ml de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos, 0.33mM de piruvato de sodio y 10 µ/ml de solución antibiótica (100X, penicilina, 10.000UI/ml; estreptomicina microgramos/ml; anfotericina B 25mg/ml) a 38.5°C.



Figura 10. Material usado en la devitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*

4.6.3 Determinación de la criotolerancia y la morfología embrionaria

Uno de los criterios de viabilidad fue la reexpansión completa del blastocele y mantenimiento de la misma, la cual se evaluó a las 6 y 18 horas, utilizando un estereomicroscopio de contraste de fase a 400X. Como criterios para la evaluación de la viabilidad y calidad embrionaria se evaluó la integridad de la zona pelucida (Sin presencia de fracturas), la reexpansión y el mantenimiento del blastocele (Mucci et al., 2006; Moore et al., 2007).

Los embriones devitrificados fueron cultivados en medio EVOLVE con 5% de suero fetal bovino, 6 mg/ml de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos, 0.33mM de piruvato de sodio y 10 μ /ml de solución antibiótica (100X, penicilina, 10.000UI/ml; estreptomicina microgramos/ml; anfotericina B 25mg/ml) a 38.5°C. Transcurridas 6 horas, se observaron los embriones y se verificarón las siguientes características morfológicas:

Blastocisto temprano: una reexpansión del blastocele en el interior del embrión, ocupando un 25% del 80% que ocupa el embrión del espacio paravitelino.

Blastocisto: un blastocele que reexpande alrededor de un 50% del embrión que ocupa casi todo el espacio paravitelino.

Blastocisto expandido: un blastocele que ocupa alrededor del 75% del espacio, con una zona pelucida considerablemente adelgazada en su espesor.

Como control se evaluaron embriones producidos *in vitro*, no vitrificados.

4.7 Cuantificación de la peroxidación lipídica

4.7.1 Evaluación del Malondialdehído (MDA)

El nivel global de peroxidación de un sistema lipídico puede ser determinado mediante la cuantificación del producto principal de oxidación de los fosfolípidos, el malondialdehído (MDA), el cual puede ser detectado y cuantificado al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Ortega et al, 2009)

Según el protocolo descrito por Tamayo y Zapata, 2010, se incubaron 50 µl de la muestra a 37°C por una hora, para luego enfriar en agua por 10 minutos, luego se adiciono 40 µl de ácido tricloroacético TCA (15%), se agito y se adicionaron 80 µl de ácido tiobarbiturico TBA (0.67%), se agito y se incubo a 90°C por 20 minutos, se enfrió en agua por 10 minutos. Se adicionaron 300 µl de Butanol y se agito por inversión durante 1 minuto; se toman 300 µl de la capa superior y se sirvió en placa multipozo, para posteriormente hacer la lectura en el espectrofluorímetro.

4.7.2 Determinación del contenido de sustancias reactivas con Dicholodihydro Fluorescein Diacetato.

Las especies reactivas de oxígeno producidas endógenamente son esenciales para la vida ya que están involucradas en varias funciones biológicas. Sin embargo, cuando hay una sobreproducción de estas especies, o cuando los antioxidantes gravemente se

agotan, estas especies reactivas se vuelven altamente perjudiciales, causando daños oxidativo a lípidos, proteínas y DNA. Las sondas fluorescentes son excelentes sensores de EROs debido a su alta sensibilidad y sencillez en la recopilación de datos (Gómez et al 2005).

La sonda fluorescente 2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetato (H_2DCFDA) es comúnmente usada para la detección de intermediarios de EROs en estudios celulares debido a su capacidad para difundirse a través de la membrana celular y ha sido usada *in vitro* por más de 20 años. Debido a una hidrólisis enzimática por esterasas intracelulares se origina 2,7-dichlorodihydrofluorescein (DCFH), un compuesto no fluorescente, que al ser oxidado origina 2,7-dichlorofluorescein (DCF) un compuesto fluorescente. Fue demostrado que DCFH es oxidado por otros EROs, tales como $HO\bullet$ * Y $ROO\bullet$ y también por especies reactivas de nitrógeno (RNS) tales como NO y $ONOO-$ (Gómez et al 2005).

Se utilizó el protocolo descrito por Gómez et al 2005; Una vez transcurridas 18 horas de la devitrificación de los embriones, estos fueron retirados del medio de cultivo y fueron lavados 3 veces en Buffer fosfato 75 mM. Posterior al lavado en un tubo eppendorf con 270 μ l de buffer (previamente caliente), se adicionaron tres embriones y posteriormente 30 μ L de H_2DCFDA y se incubaron por 10-15 minutos. En un plato multipozos se depositaron las muestras, las soluciones control, Buffer y referencia. Se verificó que la platina térmica del equipo estuviera a $52.5^{\circ}C$ y se procedió a leer en el espectrofluorímetro.

4.7.3 Determinación de sustancias reactivas de oxígeno con el ácido cis-parinámico (CAP).

Una vez pasadas las 18 horas de devitrificación, los embriones fueron retirados del medio de cultivo y lavados 3 veces en Buffer fosfato 75 mM. En un tubo eppendorf con 270 μ l de buffer (previamente caliente), se adicionaron 3 embriones, se verificó que la platina térmica del equipo este a $52.5^{\circ}C$ y en un plato multipozos se depositó la

muestra, las soluciones control, Buffer y referencia. Se Adicionaron 30 μ l de CAPw, se homogenizo y pasado un minuto, se depositó en la primera muestra, Se incubaron los embriones por 15 minutos, tomando un valor absoluto de la fluorescencia inicial y pasado este tiempo se evidencio la pérdida de la fluorescencia, leída en el espectrofluorímetro, interpretando la prueba como el incremento de la fluorescencia, es indicativo de una menor peroxidación lipídica (Martin et al, 2008)

4.8 Análisis estadístico

Los grupos de trabajo tuvieron 6 réplicas para un total de 37-45 embriones por tratamiento y 123 embriones totales. Para la evaluación de la reexpansión de los embriones devitrificados y cuantificación de MDA en el medio de cultivo se realizaron 6 réplicas, mientras que para la determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) y peroxidación lipídica en embriones se realizaron 3 réplicas. Los datos fueron sometidos a un ANOVA para el análisis de los tratamientos. Las cinéticas de fluorescencia de la producción de EROS, fueron analizadas por medio de una regresión lineal utilizando el programa Statgraphics Plus versión 2.0 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD). Las medias de cada una de las variables respuesta fueron comparadas utilizando el test de Tukey del programa Statistica versión 10.0. Las comparaciones de las medias con un $p < 0.05$ fueron consideradas significativas.

5 RESULTADOS

En este proyecto se evaluó el efecto de la dimetilformamida (DMF), como un agente crioprotector durante la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*, sobre diferentes parámetros de la calidad de embriones devitrificados, tales como, la morfología a las 6 horas, el mantenimiento de la reexpansión a las 18 horas, la cuantificación de la peroxidación lipídica y la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS).

5.1 Evaluación del crioprotector dimetilformamida sobre la morfología de embriones devitrificados.

Los embriones en etapa de blastocisto fueron vitrificados utilizando tres mezclas de crioprotectores, el tratamiento 1 (T1) está conformado por 15% dimetilformamida (DMF) y 15% de dimetilsulfóxido (DMSO). El tratamiento 2 (T2) por 20% de dimetilformamida (DMF), y el grupo control por 20% de etilenglicol (EG) y 20% de DMSO. Al devitrificar los embriones, se determinó el porcentaje de reexpansión a las 6 horas de cultivo como parámetro indicativo de la morfología embrionaria, en donde se observó un porcentaje de reexpansión de 61.9 en el T1, 91.6 en el T2 y 63.8% para el grupo control (ver tabla 3). Estos datos fueron sometidos a un análisis de varianza utilizando el programa STATISTICA 10.0 (ver tabla 4) encontrando un efecto del tratamiento ($p < 0,05$), lo que permitió realizar un posterior análisis de comparación de medias entre los grupos utilizando la prueba de Tukey (ver tabla 5).

Tabla 3 Parámetros estadísticos del porcentaje de reexpansión de embriones devitrificados a las 6 horas

Tratamiento	Media	N Número de Procesos	Total embriones evaluados	Desviación Estándar	Error Estándar
Tto 1 DMF 15% + DMSO 15%	61.9	6	41	14.57446	5.950000
Tto 2 DMF 20% + DMSO 20%	91.6	6	37	10.20621	4.166667
Control EG 20% + DMSO 20%	63.8	7	45	2.267787	0.857143

Tabla 4 Análisis de la varianza (ANOVA) del porcentaje de la de reexpansión a las 6 horas, de embriones bovinos producidos *in vitro* devitrificados.

Variable	SS	Df	MS	SS	Df	MS	F	P
	Effect	Effect	Effect	Error	Error	Error		
Reexpansión 6 horas	3396.861	2	1698.431	1613.765	16	100.8603	16.83943	0.000116

Tabla 5: Comparación de medias del porcentaje de reexpansión de embriones devitrificados a las 6 horas, mediante el test de Tukey.

TTO	1	2	Control
	M=61.9	M=91.6	M=63.8
1		0,000415	0,939450
2	0,000415		0,000675
Control	0,939450	0,000675	

Un valor de $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa.

Al comparar los porcentajes de la reexpansión a las 6 horas, de los embriones bovinos producidos *in vitro* devitrificados, se encontró que el mayor porcentaje de reexpansión fue obtenido con el tratamiento 2 (91.6%), presentando diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con respecto al tratamiento 1 y al control (ver tabla 5), mientras que los tratamientos 1 y el control presentaron porcentajes similares de reexpansión (61.9 y 63.8%, respectivamente), pero menores que el obtenido con el tratamiento 2 (91.6%) (ver figura 11).

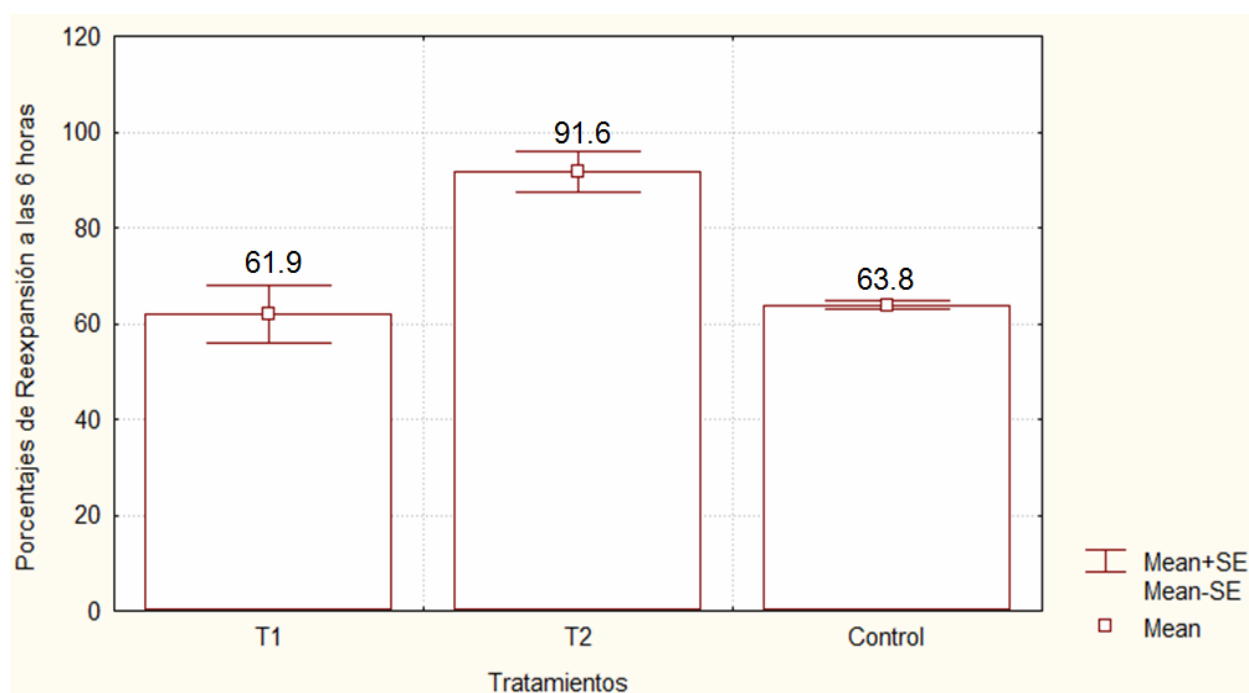


Figura 11. Porcentaje de reexpansión a las 6 horas, de embriones devitrificados.

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

Como parámetro indicativo de la sobrevivencia embrionaria, se determinaron los porcentajes de reexpansión a las 18 horas de cultivo posteriores a la devitrificación (ver tabla 6). La evaluación de los embriones se llevo a cabo bajo visión con estereomicroscopio, en donde se determino la presencia o ausencia del blastocele (ver

figura 12) (Silva et al., 2004; Camargo, 2008). Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza utilizando el programa STATISTICA 10.0 (ver tabla 7) encontrando un efecto del tratamiento ($p < 0,05$), y posteriormente se realizó un análisis de comparación de medias entre los grupos utilizando la prueba de Tukey (ver tabla 8).



Tabla 6 Parámetros estadísticos del porcentaje de reexpansión a las 18 horas, de embriones devitrificados.

Tratamiento	Media	N Número de Procesos	Total embriones evaluados	Desviación Estándar	Error Estándar
Tto 1 DMF 15% + DMSO 15%	83.3	6	41	10.20621	4.166667
Tto 2 DMF 20% + DMSO 20%	91.6	6	37	10.20621	4.166667
Control EG 20% + DMSO 20%	63.8	7	45	2.26779	0.857143



Figura 12. Embriones bovinos producidos *in vitro*, devitrificados. La flecha indica el blastocele.

Tabla 7 Análisis de la varianza (ANOVA) del porcentaje de la de reexpansión a las 18 horas, de embriones bovinos producidos *in vitro* devitrificados.

Variable	SS	Df	MS	SS	Df	MS	F	P
	Effect	Effect	Effect	Error	Error	Error		
Reexpansión	2679.634	2	1339.817	1072.524	16	67.03274	19.98750	0.000045
18 horas								

Tabla 8. Comparación de medias del porcentaje de reexpansión a las 18 horas, de embriones devitrificados, mediante el test de Tukey.

TTO	1	2	Control
	M=83.33	M=91.66	M=63.85
1		0,213566	0,001710
2	0,213566		0,000198
Control	0,001710	0,000198	

Un valor de $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa.

Al comparar los porcentajes de la reexpansión a las 18 horas 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), presentado diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con el grupo control (63.85%) (ver tabla 8, figura 13). A pesar que el porcentaje de reexpansión obtenido en el tratamiento 2 (91.66) es mayor que el obtenido en el tratamiento 1 (83.33%), no se encontró diferencia estadística ($p > 0.05$).

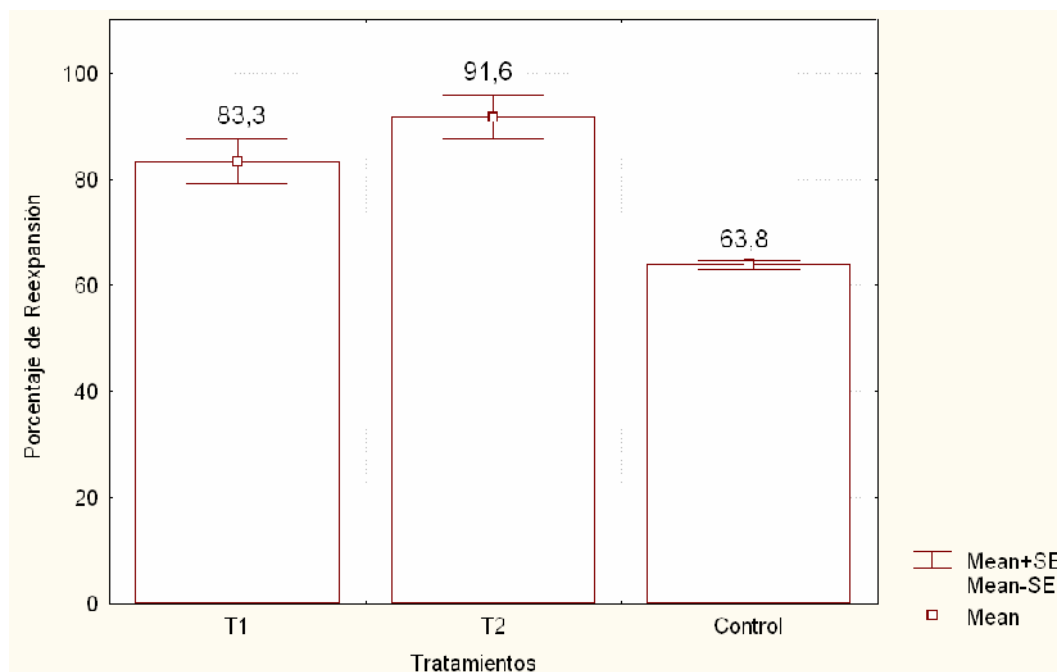


Figura 13. Comparación de las medias del porcentaje de reexpansión a las 18 horas, de embriones devitrificados.

5.3 Cuantificación de la peroxidación lipídica.

Uno de los daños más frecuentes en el sistema celular, inducido por las especies reactivas de oxígeno, es la peroxidación lipídica, la cual puede ser determinada por diferentes métodos. El primero es la cuantificación de MDA, cuyo producto principal de oxidación de los fosfolípidos, el malondialdehído (MDA), que es detectado y cuantificado al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico. De esta manera, las sustancias reactivas con el Acido Tiobarbitúrico (TBARs) se han considerado un buen método para determinar la peroxidación lipídica en diferentes medios (Rojano, 2008). El segundo método, principalmente utilizado para determinar la peroxidación lipídica intracelular, es el uso de la sonda fluorocromo análogo de ácido graso, cis ácido parinárico (CAP), el cual se intercala en la membrana celular y es susceptible a EROS, lo que conduce a la pérdida de fluorescencia (Gómes et al 2005, Martín 2008).

Para la cuantificación de la peroxidación lipídica en este trabajo se midió la producción de MDA en el medio de cultivo y la fluorescencia del CAP en embriones devitrificados.

5.3.1 Cuantificación de la peroxidación lipídica en medios de cultivo.

Con el objetivo de cuantificar la peroxidación lipídica, se midió el malonildialdehído (MDA), como producto final de la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de las membranas biológicas y del suplemento lipídico del medio de cultivo (Alvarez y Storey, 1992), considerado como uno de los parámetros para evaluar el estrés oxidativo en los organismos (Rojano, 2008).

Se determinó la concentración μM de MDA en el medio de cultivo con o sin embriones devitrificados. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ver tabla 10) y posteriormente una comparación de medias utilizando el test de Tukey (ver

tabla 11), del programa STATISTICA 10.0. La concentración más alta de la producción de malonildialdehido (MDA) se presentó en el medio de cultivo de embriones sometidos al T1 (0.126 μ M, ver tabla 9), presentando diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) con respecto a T2 (0.081 μ M), el control (0.090 μ M) y el medio sin embriones (0.092 μ M). Sin embargo los niveles de MDA encontrados en los grupos T2, control y medio sin embriones, no presentaron diferencia estadística significativa ($p > 0,05$) (ver tabla 11, figura 14).

Tabla 9. Parámetros estadísticos para la cuantificación de Malondialdehido (MDA) en el medio de reexpansión

Tratamiento	Media	N Número de Procesos	Desviación Estándar	Error Estándar
Tto 1 DMF 15% + DMSO 15%	0.125	6	0.024083	0.009832
Tto 2 DMF 20% + DMSO 20%	0.0813	6	0.019459	0.007944
Control EG 20% + DMSO 20%	0.0906	6	0.011228	0.004584
Medio	0.0927	6	0.001462	0.000597

Tabla 10. Análisis de la varianza (ANOVA) del promedio de la concentración de Malondialdehido (MDA) en el medio de reexpansión.

Variable	SS	Df	MS	SS	Df	MS	F	P
	Effect	Effect	Effect	Error	Error	Error		
MDA	0.006691	3	0.002230	0.005434	20	.000272	8.207961	0.000931

Un valor de $p < 0,05$ indica que al menos uno de los tratamientos presenta una respuesta diferencial sobre la variable evaluada.

Tabla 11. Comparación de medias de la concentración de MDA en el medio de reexpansión de embriones devitrificados a las 18 horas, mediante el test de Tukey.

TTO	1	2	Control	Medio
	M=0.126	M=0.081	M=0.090	M=0.092
1		0.000965	0.007880	0.012887
2	0.000965		0.761108	0.630271
Control	0.007880	0.761108		0.995965
Medio	0.012887	0.630271	0.995965	

Un valor de p < 0,05 indica diferencia estadísticamente significativa.

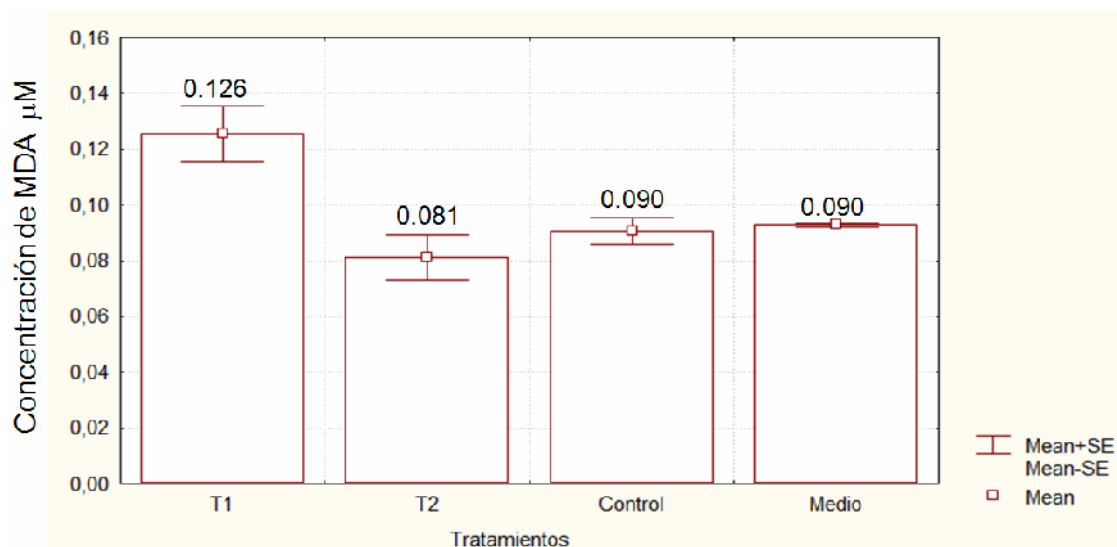


Figura 14. Concentración µM de Malondialdehído en los medios de cultivo en cada uno de los grupos.

Debido a que en medio sin embriones se presentó producción de MDA, se realizó una transformación a porcentaje, de los datos obtenidos de los medios de reexpansión, teniendo en cuenta la producción de MDA en el medio sin embriones como el 100%. De esta manera se pudo obtener una estimación de la producción de MDA en el medio de reexpansión con respecto al medio sin embriones (ver tabla 12 y figura 15).

Tabla 12. Parámetros estadísticos para el porcentaje de Malondialdehido (MDA) con respecto al medio de cultivo sin embriones.

Tratamiento	Media	N Número de Procesos	Desviación Estándar	Error Estándar
Tto 1 DMF 15% + DMSO 15%	135.26	6	25.95	10.60
Tto 2 DMF 20% + DMSO 20%	87.62	6	20.97	8.56
Control EG 20% + DMSO 20%	97.70	6	12.10	4.94
Medio	100	6	1.57	0.64

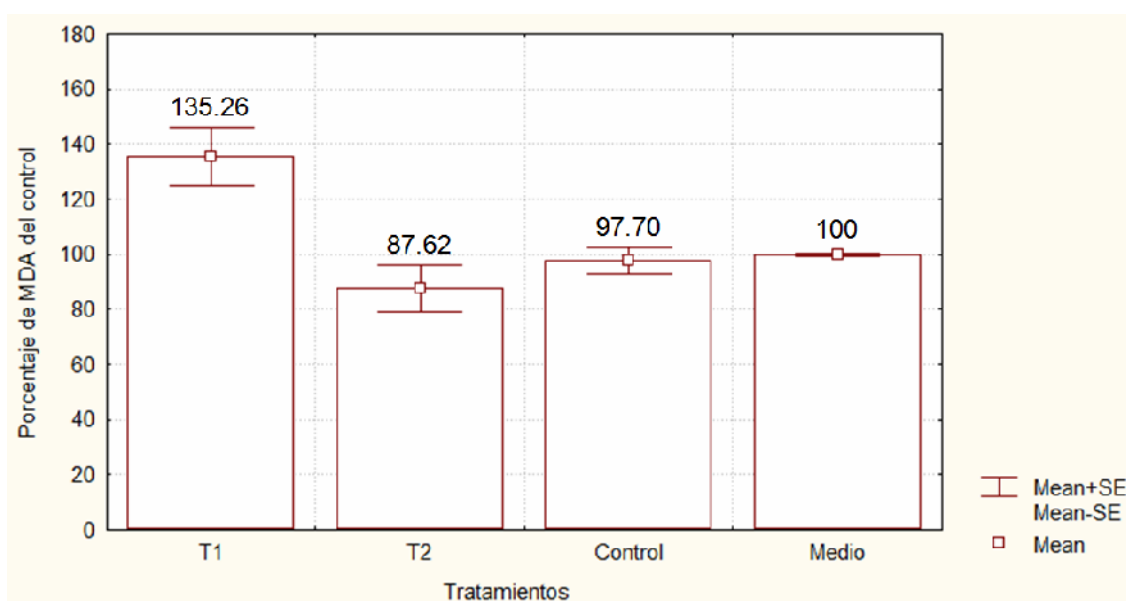


Figura 15. Porcentaje de Malondialdehido (MDA) en el medio de cultivo sin embriones

5.3.2 Cuantificación de la peroxidación lipídica en embriones producidos *in vitro* devitrificados.

Con el objetivo de cuantificar la peroxidación lipídica en los embriones producidos *in vitro* devitrificados, los embriones fueron incubados con la sonda fluorescente CAP y se

registro la fluorescencia inicial y los 15 minutos, en donde la pérdida de fluorescencia es debida a la oxidación en los embriones. Los datos fueron transformados a porcentaje de fluorescencia, teniendo en cuenta la fluorescencia inicial como el 100%. Estos datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ver tabla 14), en donde se encontró un efecto del tratamiento ($p < 0.005$) y a un análisis de comparación de medias utilizando el test de Tukey del programa STATISTICA 10.0 (ver tabla 15). El porcentaje más alto de fluorescencia CAP, se encontró en el grupo T2 (78.43%), el cual muestra una diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) con respecto a los grupos T1 (39.09%) y control (41.21%), Sin embargo, no se encontró diferencia estadística significativa ($p > 0,05$) al comparar los grupos T1 y control (39.09 y 41.21%, respectivamente) (ver tabla 13, figura 16).

Tabla 13. Porcentaje de fluorescencia CAP en embriones bovinos producidos *in vitro* devitrificados.

Tratamiento	Porcentaje de Fluorescencia CAP	N Número de Procesos	Desviación Estándar	Error Estándar
Tto 1 DMF 15% + DMSO 15%	39.090	3	1.85135	1.068878
Tto 2 DMF 20% + DMSO 20%	78.433	3	8.13500	4.696745
Control EG 20% + DMSO 20%	41.210	3	8.92000	5.149964

Tabla 14. Análisis de la varianza (ANOVA) del porcentaje de fluorescencia CAP en embriones devitrificados.

Variable	SS	Df	MS	SS	Df	MS	F	P
	Effect	Effect	Effect	Error	Error	Error		
%CAP	2937.969	2	1468.984	298.3443	6	49.72404	29.54274	0.000783

Tabla 15. Comparación de medias del porcentaje de fluorescencia CAP en embriones devitrificados, mediante el test de Tukey.

TTO	1	2	Control
	M=39.090	M=78.433	M=41.210
1		0.001358	0.928943
2	0.001358		0.001763
Control	0.928943	0.001763	

Un valor de $p < 0,05$ indica diferencia estadísticamente significativa.

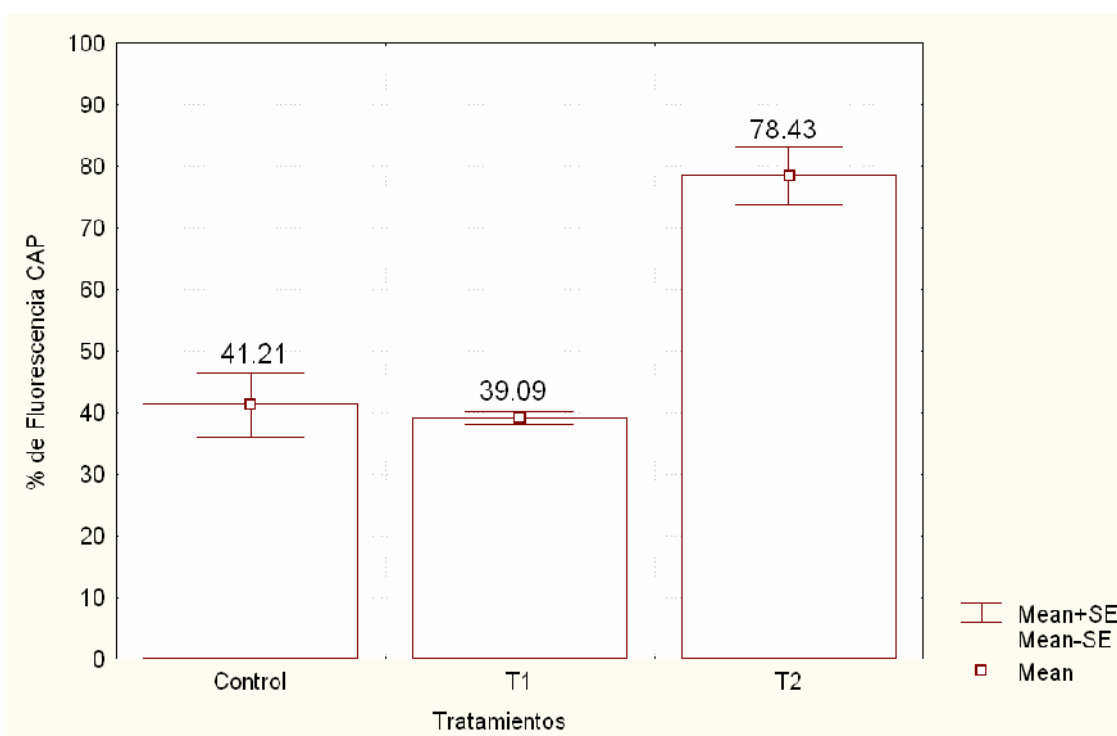


Figura 16. Porcentaje de de Fluorescencia CAP en embriones bovinos devitrificados

5.4 Cuantificación de los niveles de especies reactivas de oxígeno EROS en embriones bovinos producidos *in vitro* devitrificados

Para la cuantificación de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS), se midió la cinética de emisión de fluorescencia en el tiempo de la sonda 2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetato (H₂DCFDA). El registro de de la unidades relativas de fluorescencia fue realizado por 3500 segundos, con un intervalo de cuantificación de 60 segundos. Todas las mediciones de fluorescencia fueron realizadas en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer S5 regulando la temperatura a 38.5°C.

Todos los datos de cada experimento, fueron ajustados para realizar un análisis de regresión lineal, el ajuste seleccionado, busca tener un R² más cercano a 1, y este análisis arroja una pendiente que indica el incremento de fluorescencia de cada tratamiento (ver tabla 16). Los datos de las pendientes fueron sometidos a un análisis de varianza (ver tabla 17) y posteriormente se realizó un análisis de comparación de medias (ver tabla 18), utilizando el programa STATISTICA 10.0.

Tabla 16. Parámetros estadísticos de pendientes de fluorescencia H₂DCFDA en embriones bovinos producidos *in vitro* devitrificados

Tratamiento	Media de pendiente	N Número de Procesos	Desviación Estándar	Error Estándar
Tto 1 DMF 15% + DMSO 15%	0.006624	3	0.000948	0.000547
Tto 2 DMF 20% + DMSO 20%	0.004307	3	0.000254	0.000146
Control EG 20% + DMSO 20%	0.004206	3	0.000421	0.000243
Sin vitrificar	0.003951	4	0.000615	0.000308

Tabla 17. Análisis de la varianza (ANOVA) de las pendientes de fluorescencia del H₂DCFDA en embriones bovinos producidos *in vitro* devitrificados.

Variable	SS	Df	MS	SS	Df	MS	F	P
	Effect	Effect	Effect	Error	Error	Error		
EROS	0.000015	3	0.000005	0.000003	9	0.000000	12.77221	0.001357

Tabla 18. Comparación de medias de pendientes de fluorescencia H₂DCFDA en embriones bovinos producidos *in vitro* devitrificados, mediante el test de Tukey.

TTO	1	2	Control	Sin vitrificar
	M=0.006624	M=0.004307	M=0.004206	M=0.003951
1		0.005866	0.004493	0.002373
2	0.005866		0.997011	0.891771
Control	0.004493	0.997011		0.955329
Sin vitrificar	0.002373	0.891771	0.955329	

Un valor de p 0,05 indica diferencia estadísticamente significativa.

El valor de pendiente de la fluorescencia de H₂DCFDA más alto se presentó en los embriones sometidos al T1 (0.006624, ver tabla 16), presentando diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) con respecto a T2 (0.004307), el control (0.004206) y con el grupo de embriones no vitrificados (0.003951). Sin embargo las pendientes de fluorescencia obtenidas en los grupos T2, control y embriones no vitrificados, no presentaron diferencia estadística significativa ($p > 0,05$) (ver tabla 18, figura 17).

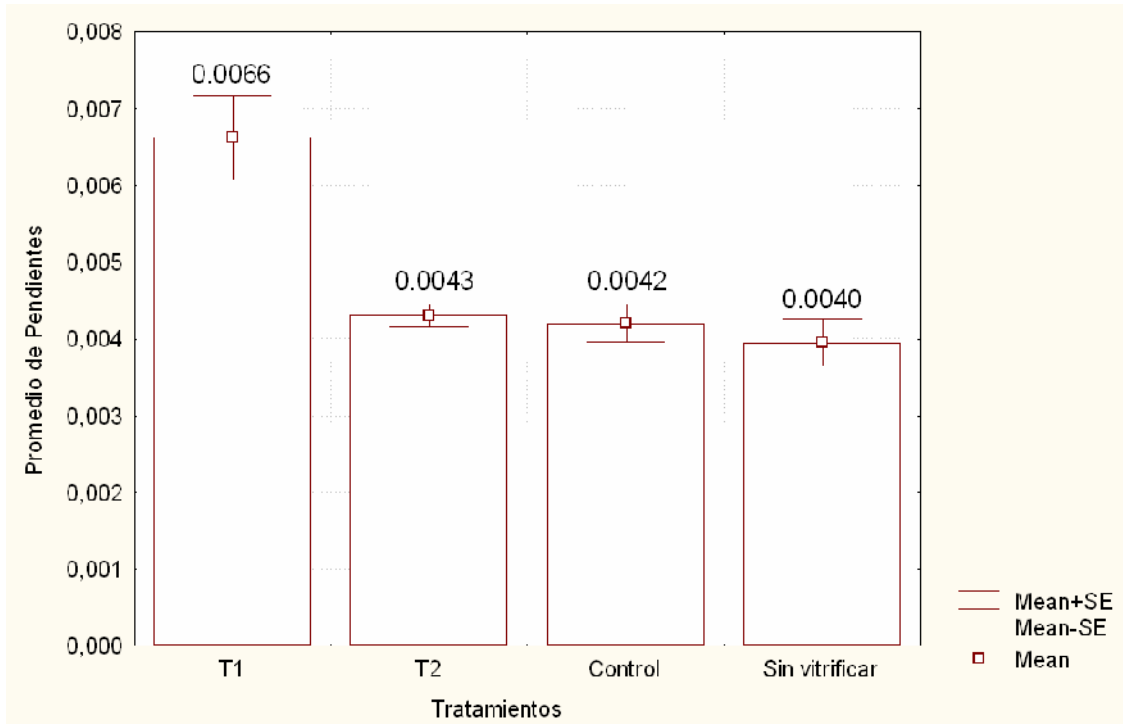


Figura 17. Comparación de las medias de pendientes de fluorescencia H₂DCFDA en embriones bovinos producidos *in vitro* devitrificados.

Para determinar el aumento de fluorescencia entre los grupos evaluados se utilizó la fórmula $(ms - mc / mc) \times 100$, en donde **ms** es la media de pendientes del grupo experimental y **mc** es la media de pendientes del grupo control (Rojano et al., 2008). El signo negativo del valor nos indica que el grupo experimental disminuye la producción de EROs, mientras que el signo positivo nos indica el aumento en la generación de EROs.

Se determinó el efecto de la vitrificación sobre la producción de EROs, teniendo como grupo control (**mc**), los embriones no vitrificados. En donde se encontró que el grupo T1 presenta un aumento del 67.65% con respecto a la fluorescencia reportada por los embriones no vitrificados, mientras que el aumento del porcentaje de fluorescencia para el T2 y el control (20% EG+ 20% DMSO), fue del 9.01 y 6.45%, respectivamente (ver tabla 19).

Tabla 19 Efecto de la vitrificación sobre el porcentaje de aumento de la fluorescencia

Tratamientos	Porcentaje de aumento de fluorescencia
T1	67.65
T2	9.01
Control (EG 20% + DMSO 20%)	6,45

Adicionalmente, se evaluó efecto del tratamiento sobre la producción de EROS, teniendo como grupo control (**mc**), el tratamiento EG 20% + DMSO 20%. De esta manera se puede observar que el tratamiento T2 presenta un aumento del 2% en el porcentaje de fluorescencia, mientras que en el tratamiento T1 fue del 57.48% (ver tabla 20).

Tabla 20. Efecto del tratamiento de vitrificación sobre el aumento de la fluorescencia

Tratamientos	Porcentaje de aumento de fluorescencia
T1	57.48
T2	2.40

6. DISCUSIÓN

El interés en la criopreservación de oocitos y embriones ha aumentado debido al rápido desarrollo de las tecnologías de reproducción asistida tales como, la maduración de oocitos, la fertilización y el cultivo *in vitro* de embriones (Cetin y Bastan, 2006). Sin embargo grandes esfuerzos se han centrado en el desarrollo o perfeccionamiento de la criopreservación de embriones producidos tanto *in vivo* como *in vitro*, lo que conducirá a un aporte importante para masificar el uso de la técnica de transferencia de embriones a gran escala (Dyynes et al, 2006). No obstante, uno de los principales problemas con relación a la supervivencia de los embriones producidos *in vitro* es la alta sensibilidad a la criopreservación, debido a los efectos nocivos de las bajas temperaturas y la concentración de crioprotectores, por lo que se han planteado muchos estudios con el objetivo de reducir el daño causado por la criopreservación, mediante el aumento de la curva de enfriamiento y calefacción, para que las células sean expuestas la mayor brevedad posible a las condiciones de temperatura perjudiciales (Vajta et al, 1997a; Rodríguez, 2009). De esta manera se han desarrollado métodos, como la vitrificación o congelación ultrarrápida, uno de los métodos mas utilizados actualmente para criopreservar embriones (Rodríguez, 2009).

El beneficio de la vitrificación es la no formación de cristales de hielo a través de un aumento en la velocidad de la conducción de temperatura, lo que permite un aumento significativo en las tasas de enfriamiento (Lieberman et al, 2002). Hay muchas variables en el proceso de vitrificación que pueden influir en las tasas de supervivencia de los embriones, entre ellas, tenemos: 1) el tipo y concentración del crioprotector, 2) la temperatura de la exposición a la solución de vitrificación, 3) la duración de la exposición al crioprotector antes de la inmersión en nitrógeno líquido, 4) el tipo de dispositivo utilizado para la vitrificación (que influye en la velocidad de enfriamiento) y 5) la calidad y el estado de desarrollo de los embriones sometidos a la criopreservación (Sommerfeld y Niemann, 1999; Liebermann et al., 2002; Donnay et al., 1998; Dynnys et al., 2006).

Con la introducción de la técnica de la pajilla abierta y estirada, OPS (*Open Pulled Straws*) en la vitrificación, se ha mejorado las tasa de sobrevivencia de los embriones criopreservados con respecto al método convencional de congelación lenta (Lopatarova et al., 2002; Mucci et al., 2006). Adicionalmente, se han enfocado los esfuerzos en la búsqueda de nuevos crioprotectores y las posibles combinaciones entre ellos, con el fin de mejorar la calidad de los embriones devitrificados (Lopatarova et al., 2002; Camargo et al., 2004).

Entre los compuestos que se han planteado como posibles agentes alternativos crioprotectores estan las amidas, entre ellos la dimetilformamida (DMF), debido 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, más eficientes que el glicerol y el etilen glicol y menos eficiente que el 1,2 propanodiol (Baudot y Boutron, 1998). Además ha sido evaluada su toxicidad en diferentes sistemas como son, el cultivo de embriones de crustáceos (Huang et al., 2011), peces (Chen y Tian, 2005), roedores (Augustine et al., 2004) y en bovinos se ha evaluado el efecto de la exposición de la DMF en combinación con EG ó DMSO en oocitos y embriones, en protocolos de vitrificación (Carvalho, 2006). En el presente trabajo, los embriones bovinos producidos *in vitro* fueron expuestos a diferentes combinaciones de crioprotectores, en las cuales se incluyo la DMF a dos concentraciones (15% y 20%) con DMSO (15% y 20%), y una combinación EG 20% + DMSO 20% como grupo control. Con el fin de evaluar el efecto de soluciones de crioprotectoras sobre la viabilidad posterior a la devitrificación, se seleccionaron los embriones en la etapa de blastocisto (día 7), debido a que pueden tolerar mejor los tratamientos de la crioconservación (Hasler et al 1997; Sommerfeld y Niemann, 1999; Markkula et al, 2001).

Cuando se evaluó 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 2006 (0%), y menor que el reportado por Camargo et al., en el 2004 (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 (ver figura 11). Adicionalmente, al evaluar el mantenimiento de la reexpansión de los embriones devitrificados, como uno de los parámetros más utilizados para evaluar la sobrevivencia de los embriones sometidos a la criopreservación (Rizos et al., 2003), se determinó el porcentaje de reexpansión a 18 horas, en donde los grupos que presentaron los porcentajes más altos fueron aquellos que tenían las concentraciones DMSO + DMF 15% y DMSO + DMF 20% (83,3% y 91,6%, respectivamente), similares a los reportados por Laparatova y colaboradores en el 2002, mientras que el control presentó un 63,8% de reexpansión (ver figura 13). A pesar de encontrar un alto porcentaje de reexpansión a las 18 horas, de embriones devitrificados en los grupos que contenían la combinación DMF+DMSO, comparado con los reportados por otros trabajos a las 24 horas de cultivo (Rizos et al., 2003; Camargo et al., 2004; Carvalho et al., 2006, Varago et al., 2006), se debe tener en cuenta que la viabilidad del embrión devitrificado disminuye con respecto al tiempo de cultivo (Rizos et al., 2003), sin embargo en este trabajo sólo se evaluó el mantenimiento de la reexpansión hasta las 18 horas.

Al comparar las tasas de supervivencia de los blastocistos producidos *in vitro* después de la vitrificación del tratamiento control (63,8%), se encontró que fueron similares a las descritas por Donnay et al. (1998) con un 67%, mientras que fueron inferiores a las reportadas por Kuwayama et al. (1992) con 87%, Dinnyes et al. (1995) con 81%, Mahmoudzadeh et al. (1995) con un 69-89%, Vajta et al. (1995) con un 84%, pero superiores a las reportadas por Varago et al. (2006) con un 33-44% de reexpansión y Guerra et al. (2011) con un 40% de reexpansión.

La supervivencia de los embriones bovinos producidos *in vitro* devitrificados puede ser afectada por diversos factores, como las condiciones de cultivo y la suplementación de los medios de cultivo, siendo uno de los más utilizados, el suero fetal bovino (SFB) (Seidel, 2006), en donde los embriones producidos con el suplemento de SFB, tienen una acumulación intracelular de lípidos anormales (Abe y Hoshi, 2003), menor supervivencia (Abe et al., 1999; Rizos, 2003), y disminución en la tasa de eclosión de los embriones después de su descongelación (Rizos, 2003; Mucci et al., 2006). Sin embargo, el efecto contrario se ha observado al vitrificar en OPS, embriones de

porcinos producidos *in vitro*, en donde se encontró que los blastocistos producidos en presencia de suero, presentaron una mayor capacidad para sobrevivir a la criopreservación y un mayor número de células viables en comparación con los blastocistos producidos en el medio de cultivo libre de suero. Lo anterior sugiere que el efecto del suero sobre el proceso de la criopreservación genera diferentes respuestas dependiendo de la especie (Men et al, 2005).

Al evaluar el efecto de la solución de vitrificación sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en el embrión devitrificado, las cuales pueden afectar las moléculas de su entorno, como son los lípidos del medio de cultivo (Mateus et al, 2011), generando la peroxidación lipídica, que fue determinada por los niveles de malonaldehído MDA, utilizando el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs). Este ha sido considerado como un biomarcador de estrés oxidativo en fluidos biológicos, entre ellos el líquido folicular (Gupta et al., 2010). De esta manera se cuantificarán los niveles de MDA en el medio de cultivo a las 18 horas, con o sin embriones devitrificados, encontrando los niveles mas altos de MDA ($0,126\mu\text{M}$) en el medio con embriones sometidos al tratamiento de vitrificación 1 (DMSO 15%+ DMF 15%), seguido por los niveles de los grupos de tratamiento 2, control y medio sin embriones ($0,081\mu\text{M}$, $0,090\mu\text{M}$ y $0,092\mu\text{M}$, respectivamente) (ver figura 14). Sin embargo, debido a que las condiciones de incubación (Takenaca et al, 2007) y los suplementos del medio de cultivo, como el suero, pueden inducir la producción de EROs (Takenaca et al, 2007; Martín et al, 2008 y Du Plessis et al, 2008), la concentración de MDA fue normalizada a porcentaje de producción de MDA del medio sin embriones, de esta manera se puede decir que el medio con embriones sometidos al tratamiento de vitrificación 1 (DMSO 15%+ DMF 15%) produjo un 35.26% mas de MDA con respecto al medio sin embriones (ver figura 15), mientras que el medio con embriones sometidos al tratamiento de vitrificación 2 (DMSO 20%+ DMF 20%) presento 12,38% menos de MDA con respecto al medio sin embriones, pero esta diferencia en la producción de MDA no es significativa (ver tabla 11). Estos resultados son un hallazgo interesante debido a que son descritos por primera vez en medio de cultivo para embriones bovinos devitrificados, además se encontró una relación con la con la tasa de reexpansión.

Para la determinación de la peroxidación lipídica en los embriones devitrificados, se utilizó el fluorocromo análogo de ácido graso cis ácido parinámico (CAP), el cual pierde fluorescencia al ser oxidado por las EROs (Gomes, 2005), permitiendo determinar la peroxidación lipídica a nivel celular (Martín et al., 2008). De esta manera se cuantifico el porcentaje de pérdida de fluorescencia en los embriones devitrificados, encontrando la mayor pérdida de fluorescencia en los embriones sometidos al tratamiento de vitrificación 1 (DMSO 15% + DMF 15%) (60,9%), seguido por los grupos control (58,8%) y tratamiento 2 (DMSO 20% + DMF 20%) (21,6%), lo que indica que los embriones sometidos a la vitrificación con el tratamiento 1 presentaron mayor peroxidación lipídica que los otros grupos experimentales (ver figura 16). Este resultado se asocia con la concentración de MDA en el medio de cultivo del tratamiento 1, que presento los niveles mas altos comparado con el tratamiento 2 y control (ver figura 14), mostrando que las técnicas utilizadas para evaluar la peroxidación lipídica son complementarias, debido a que la cuantificación de la pérdida de fluorescencia del fluorocromo CAP nos indica la peroxidación lipídica en su etapa inicial de oxidación lipídica (Gómez, 2005), mientras que la cuantificación de MDA suministra la información del producto final de la peroxidación lipídica (Burchan, 1998).

Para la determinación de los niveles de producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), se utilizó el fluorocromo 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA), el cual es permeable a membrana y gana fluorescencia al ser oxidado, propiedades que lo hacen una excelente sonda para la cuantificación de EROs intracelular (Gómez, 2005). Al comparar la cinética de fluorescencia de embriones sometidos a la vitrificación en los diferentes tratamientos, se encontró que la pendiente mas alta relacionada con la producción de EROs fue obtenida en los embriones devitrificados del tratamiento 1 (ver figura 17), mientras que los embriones devitrificados de los tratamientos 2 y control, no presentaron diferencia con los niveles producidos por embriones no vitrificados (ver tabla 18). Estos niveles de producción de EROs en los embriones devitrificados del tratamiento 1, son consistentes con los resultados encontrados de peroxidación lipídica, tanto de producción de MDA, como con la pérdida de fluorescencia CAP. Sugiriendo que a pesar de encontrar un porcentaje

de reexpansión del 83,3%, el tratamiento 1, induce una mayor producción de EROS que son altamente reactivos con moléculas tales como, proteínas, lípidos y ADN, que pueden generar daños severos como inactivación enzimática, disfunciones mitocondriales y fragmentación de ADN (Guérin et al., 2001). En embriones de ratón y hámster, las EROs se han asociado a un aumento en el índice de apoptosis y a la disminución del desarrollo post-implantatorio (Takenaka et al., 2007). Sin embargo la producción de EROs no solamente esta limitada al embrión, sino que otros factores externos como las condiciones de incubación (Takenaka et al, 2007) y los suplementos del medio de cultivo (Martín et al, 2008 y Du Plessis et al, 2008), la concentración de oxígeno (Fujitani et al., 1997), pueden aportar EROs para conducir a un desbalance del estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos en este trabajo con la combinación DMF + DMSO responden al planteamiento realizado por Baudot y Boutron (1998), en donde evalúan la capacidad de los crioprotectores tipo amidas como la Dietilformamida y DMF, más eficientes que el Glicerol y Etilenglicol y menos eficientes que el propanodiol en el proceso de la vitrificación lo que condujo a la posibilidad de evaluar combinaciones de crioprotectores que incluyan los tipo amidas.

Con base en los resultados obtenidos, la vitrificación con la solución 20% DMSO + 20% DMF (Tratamiento 2), es un protocolo alternativo al convencional (20% EG + 20% DMSO), que presento un porcentaje mayor de reexpansión, menor peroxidación lipídica, menor producción de EROs y de TBARs. Estos efectos benéficos sobre la viabilidad de embriones bovinos criopreservados en presencia de DMF también han sido descritos por Carvalho en el 2006. Esta respuesta podría ser debido a que la DMF por poseer un mayor número de grupos metilos es una molécula más estable y con mayor capacidad crioprotectora, la cual es una ventaja frente a los demás crioprotectores tipo amida utilizadas en la vitrificación, como son la acetamida y formamida (Fahy, 1986). Sin embargo se requieren estudios en los que se evalúe el mantenimiento de la reexpansión por más tiempo y la implementación de otras pruebas que validen la viabilidad embrionaria. Además se plantea la necesidad de evaluar los efectos sobre estructuras celulares como son la membrana celular, citoesqueleto,

mitocondrias, su potencial efecto genotóxico y la determinación de la tasa de implantación de embriones devitrificados, que permitan adoptar este protocolo en la criopreservación de embriones bovinos.



7. CONCLUSIONES

La combinación 15% DMF + 15% DMSO, presenta efectos nocivos en la criopreservación de los embriones, expresado en una mayor producción de especies reactivas de oxígeno y mayor peroxidación lipídica.

La combinación de los crioprotectores 20% DMSO + 20% DMF durante la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*, presentan la menor producción de TBARS y de EROs, el menor porcentaje de peroxidación lipídica y mantiene la morfología y la capacidad de reexpandir o recuperar el blastocelo, después de la descongelación y la rehidratación de los embriones

La producción de EROs, la peroxidación lipídica y la cuantificación de TBARS pueden ser utilizados como biomarcadores de la calidad de embriones devitrificados

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresarles mis agradecimientos a mi Madre, quien apoyo este proceso, pero no alcanzo a verlo culminado, para ella mi admiración y respetos eternos.

A mi esposa Patricia, por su apoyo incondicional y a Manuela recién llegada a nuestras vidas y es motivación para seguir adelante.

A dos de mis maestros que supieron inculcarme el amor a la reproducción Animal, respectivamente, los profesores Jorge Gómez Oquendo y Hemerson Moncada Ángel.

Al Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid y la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín por la financiación de la presente investigación.

Al Profesor Neil Vásquez Araque. Por su dirección y asesoría para la realización de este estudio

Al Dr. Fabio Nelson Zuluaga Tobón, por sus enseñanzas en el campo de la investigación científica, por sus palabras de respeto y sus sabios consejos.

Al Grupo de Investigación en Biotecnología Animal GIBA, por su apoyo permanente para la realización del presente estudio

Al Grupo de Biotecnología Animal y su línea de investigación Gametos y Embriones, por permitir la realización de los procesos biológicos y logísticos para la realización del presente estudio

A las Ingenieras Biológicas Viviana Torres Osorio y Diana Maturana Mena por su invaluable ayuda y colaboración en todas las fases de este proceso.

Al Laboratorio de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín por permitir la realización de las pruebas para la cuantificación de la peroxidación lipídica y de especies reactivas de oxígeno en los embriones devitrificados

A mi compañero Juan Camilo Álvarez Balbin por sus consejos y asesorías en los momentos críticos del proceso.

Al personal administrativo y empleados de la Planta de Beneficio del municipio de Girardota, por la colaboración permanente durante el tiempo de realización de la fase experimental de esta investigación.



BIBLIOGRAFÍA

ABE, H; YAMASHITA, S; ITOH, T; SATOH, T; HOSHI, H. 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; 5: 325-335

ABE, H; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum free media. Journal of Reproducción and Development. 2003; 49 (3): 193-202

AGCA Y, MONSON R, NORTHEY D, SCHAEFER D, RUTLEDGE J. Postthaw pregnancy rates comparison of vitrified and frozen in vitro produced bovine embryos. Theriogenology. 1996; 45:175

ALBARRACIN MONJE J. Vitrificación de ovocitos 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; 2005a

ALBARRACÍN, JL.; MORATÓ, R.; ROJAS, C.; MOGAS, T. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of in vitro matured prepubertal and adult bovine oocytes. Theriogenology. 2005b; 63: 890-901.

ALI, J.; SHELTON, J.N. Successful vitrification of day-6 sheep embryos. J Reprod Fertil. 1993; 99: 65-70.

ALI, A y SIRARD, A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. Biol Reprod. 2003; 66: 901-905.

ALI, J; SHELTON, JN. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. J Reprod Fertil. 1993; 99: 471-477.

ALVARENGA, MA.; GRAHAM, JK.; KEITH, SL.; LANDIM-ALVARENGA, FC.; SQUIRES, EL. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. in: International Congress on Animal Reproduction, 2., 2000, Stockholm. Proceedings Stockholm, 2000; 1729.

ALVARENGA MA, FERNANDES CB, LANDIM-ALVARENGA FC. Criopreservation of equine embryos. Acta Sci Vet. 2007; 35(3): 799-809.

ALVAREZ, JG y STOREY, B. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. J Androl. 1992; 13: 232-241

AMORIM, C.; GONCALVES, P.; FIGUEIREDO, J. Cryopreservation of oocytes from pre-antral follicles. Hum Reprod Upd. 2003; 9 (2): 119-129.

ARTEAGA, X; SHÜLER, C; GATICA, R. Primer nacimiento de un ternero en Chile por transferencia de un embrión vitrificado. En: XXVII Reunión Anual Sociedad Chilena de Producción Animal. Chillán - Chile. 2002a: 201-202.

ARTEAGA X; SHÜLER, C; GATICA, R. Primeros resultados de sobrevivencia de embriones bovinos vitrificados a los 7 y 10 días de cultivo in vitro. En: XXVII Reunión Anual Sociedad Chilena de Producción Animal. Chillán - Chile. 2002b: 203-204.

ARAV, A. Vitrification of oocytes and embryos In: LAURIA, A., GANDOLFI, F., Embryonic Development and Manipulation in Animal Production. Port Press, London and Chapel Hill. 1992; 22: 255-264.

ARAV, A.; ZERON, Y; OCHERETNY, A. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. Theriogenology. 2003; 53: 258.

AUGUSTINE-RAUCH, K; ZHANG, Q; KLEINMAN, M; LAWTON, R; WELSH, M. A study of vehicles for dosing rodent whole embryo culture with non aqueous soluble compounds. Reprod Toxicol. 2004; 18: 391-398

BAUDOT A.; BOUTRON, P. Glass forming tendency and stability of aqueous solutions of diethylformamide and dimethylformamide. Cryobiology. 1998; 37: 187-199.

BARIL G, TRALDI AL, COGNIÉ Y, LEBOEUF B, CBECKERS, JF, MERMILLOD P. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*. 2001; 56: 299-305.

BUNN S ET AL. Reduction in cryoprotectant concentrations on the vitrification of immature bovine oocytes, under a high cooling rate. *Acta Sci Vet*. 2006; 34: 309.

BURCHAM, P. Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. En: *Mutagenesis* 1998; 13(3): 287-305

CABRERA, P; FERNÁNDEZ, A; BASTIDAS, P; PEROZO, E; MOLINA, M; BETANCUR, A; DÍAZ, T. Vitrificación: Una alternativa para la criopreservación de embriones. En: *Rev. Fac. Cienc. Vet. Maracay*. 2006; 47(1)

CAMARGO, L; OLIVEIRA, R; VIANA, JH; SÁ, WF; FERRERIRA AM; Y RAMOS, A. Comparación of two vitrification protocols for crossbred *Bos taurus* x *Bos indicus* in vitro produced embryos. Conferencia Anual International Embryo Transfer Society IETS, *Reproduction, Fertility and Development*. 2004; 164

CAMARGO, LS. Producción in vitro de embriones. EMBRAPA. Primer Encuentro Internacional de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín. 2008

CARVALHO, E. Vitriificação de ovócitos e embriões bovinos utilizando-se etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida como agentes crioprotetores. (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

CATHCART, R; SCHWIERS, E; AMES, BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem*. 2006; 134: 111-116

CELESTINOS, M y GATICA, R. Vitrificación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. En: *Arch. Med. Vet. Valdivia*. 2002; 34 (2): 13.

CETIN, Y.; BASTAN, A. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification on straws. *Anim. Reprod. Sci.* 2006; 92: 29-36.

CHEN SU et al. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straw (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum Reprod.* 2001; 16: 2350-2356.

CHEN, SL Y TIAN, YS. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology.* 2005; 63: 1207-1219

CHO SK et al. Improvement in post-thaw viability of in vitro-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Anim Reprod Sci.* 2002; 73: 151-158.

CREMADES, N ET AL. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. *Hum Reprod.* 2004; 19: 300-305.

CUELLO, C; GIL MA; ALMIÑANA C; SÁNCHEZ, J; PARRILLA I; CABALLERO I; VÁZQUEZ JM; ROCA J; RODRÍGUEZ, H; MARTÍNEZ; EA. Vitrification of in vitro cultured porcine two-to-four cell embryos. *Theriogenology.* 2007; 60: 258-264

CUELLO C; SÁNCHEZ, J; ALMIÑANA C; GIL MA; PERALS ML; LUCAS X; ROCA, J; VÁZQUEZ, JM; MARTÍNEZ, EA. Effect of the cryoprotectant concentration on the in vitro embryo development and cell proliferation of OPS-vitrified porcine blastocysts. *Criobiology.* 2008; 56: 189-194

CUTAIA, L; BÓ, G. Cattle embryo production and trade in Argentina. *Acta Sci Vet.* 2007; 35(3): 931-944.

DHALI, A; MANIK, RS.; DAS, SK.; SINGLA, SK.; PLATA, P. Post-vitrification survival and in vitro maturation rate of buffalo (*bubalus bubalis*) oocytes: effect of ethyleneglicol concentration and exposure time. *Anim Reprod Sci.* 2003; 63: 159-165.

DE COSIO, MA. Morfología y Evaluación de Embriones. En Simposio Regional de Reproducción Bovina. 2008; 5.

DESAI N, LAWSON J, GOLDFARB J. Assessment of growth factor effects on post-thaw development of cryopreserved mouse morulae to the blastocyst stage. *Hum Reprod*; 2000; 15: 410-418.

DINNYES, A.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; SOLTI, L.; MASSIP, A.; MERMILLOD, P. In vitro survival of in vitro produced bovine embryos frozen or vitrified by techniques suitable for direct transfer. *Theriogenology*. 1995; 43: 197.

DINNYÉS, A; DAI, S; SIANG, S; YANG, S. Somatic cell nuclear transfer with vitrified recipient oocytes in cattle. *Theriogenology*. 2000; 53: 215.

DINNYES, A; MENG, O; POLGAR, Z; BOONKSOL, D; SOMFAI, T. Criopreservação de embriões mamíferos. *Acta Sci Vet*. 2006; 1: 171-190.

DINNYES A; NEDAMBALE TL. Cryopreservation of manipulated embryos: tackling the double jeopardy. *Reprod, Fert and Dev*. 2009; 21: 45-59.

DING, FH; XIAO, ZZ; LI, J. Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos. *Theriogenology*. 2007; 68: 702-708

DOBRINSKY JR. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*. 1996; 45: 17-26

DOBRINSKY JR, PURSEL VG, LONG CR, JOHNSON LA. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol Reprod*. 2000; 62: 564-570

DOBRINSKY, JR. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*. 2002; 57: 285-302.

DODE, A; PEREIRA, D; RUMPF, R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*. 2005; 63 (4): 1131-1141.

DONNAY, I.; AUQUIER, PH.; KAIDI, S.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MERMILLD, P.; MASSIP, A. Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. *Anim Reprod Sci*. 1998, v.52, p.93-104.

DRUMMEN; GP; GADELLA BM, POST JA, BROUWERS JF. Mass spectrometric characterization of the oxidation of the fluorescent lipid peroxidation reporter molecule C11-BODIPY(581/591). *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1635- 44.

DU PLESSIS; MAKKER, K; DESAI, N Y AGARWAL, A. Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Rev Obstet Gynecol.* 2008; 3(4) p 539-554

ECKERT J AND NIEMANN H. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocyte in protein-free media. *Theriogenology.* 1995; 43: 1221-1225

EROGLU A, LAWITTS JA, TONER M, TOTH TL. Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. *Cryobiology.* 2003; 46:121-34.

EKKO, K; TIMASHEFF, SN. Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry.* 1981; 20: 4667-4676.

FAHY, GM; MACFARLANE, D; ANGELL, CA; MERYMAN, HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology.* 1984; 21(4): 407-426.

FAHY, GM; W.F. RALL, Vitrification: A new approach to embryo cryopreservation *Theriogenology.* 1985; 23, (1): 220.

FAHY, GM. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology.* 1986; 23: 1-13

FAHY, GM; LILLEY, TH; LINDELL, H; DOUGLAS, MSJ; MERYMAN, HT. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology.* 1990; 27: 247-268

FAHY, GM. Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology.* 2010; 60: 545-553

FRENCH, AJ.; HALL, VJ.; KORFIATS, NA.; RUDDOCK, NT.; VAJTA, G. LEWIS, IM.; TROUNSON, AO. Viability of cloned bovine embryos following ops vitrification. Annual Conference International Embryo Transfer Society, 2002, foz do iguassu. Proceedings foz do iguassu, 2002; p.413.

FUJITANI Y, KASAI K, OHTANI S, NISHIMURA K, YAMADA M, UTSUMI M. Effect of Oxygen Concentration and Free Radicals on In Vitro Development of In Vitro-Produced Bovine Embryos. *J Anim Sci.* 1997;75:483-489.

FUKUI, Y; LEE, ES; ARAKI, N. Effect of medium renewal during culture in two different culture systems on developmental to blastocysts from in vitro produced early bovine embryos. *J Anim Sci.* 1995; v.74, p. 2752-2758

GAY C, COLLINS J, GEBICKI J. Hydroperoxide assay with the ferric xylenol orange Complex. *Anal. Biochem.* 1999; 273 (2): 149-155

GANDHI AP, LANE M, GARDNER DK AND KRISHER RL. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *En: Hum Reprod.* 2000; Vol. 15, No. 2, p. 395-401

GOMES, A; FERNANDES, E; LIMA, J. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Met.* 2005; Vol 65 p 45-80

GUERRA, A; SOLÍS, G, SANDOYA, L Y DE ARMAS, R. Evaluación de tres protocolos de criopreservación de embriones bovinos obtenidos in vitro e in vivo. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba IRAC. 2011; 309

GUERIN, P; MOVATASSIM, S y MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen oxygen species in the preimplantación embryo and its surrounding. *Hum Repr Upd.* 2010; Vol 7 No 2 p 175-189

GUIGNOT, F. Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. *INRA Prod Anim.* 2005; 18 (1): 27-35

GUPTA, S; SEKHON, L; KIM, L AND AGARWAL, S. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Assisted Reproduction. *Current Women's Health Reviews.* 2010; 6: 227-238

GUZMÁN-CHOZAS, M. VICARIO, I. AND GUILLÉN-SANS, R. Spectrophotometric profiles of off-flavor aldehydes by using their reactions with 2-thiobarbituric acid. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 45(7): 2452-2457.

HAMAWAKI, A; KUWAYAMA, M; HAMANO, S. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. *Theriogenology* 1999; 51:165.

HAN, B. AND BISCHOF J. C. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. *Cryobiology*. 2004; 48: 8-21

HANADA, A; NAGASE, H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1980; 60: 247-252

HASLER, JF; HURTGEN, PJ; JIN, ZQ; STOKES, JE. Survival of IVF derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology*. 1997; 46: 563-579

HASLER, JF. Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. *Reprod, Fertil and Dev.* 2010; 22: 119-125

HE, X; PARK, EYH; FOWLER, A; YARMUSH, ML; TONER, M; Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz micro-capillary: A study using murine embryonic stem cells. *Cryobiology* 2008; 56: 223-232.

HOCHI, S.; AKIYAMA, M.; MINAGAWA, G.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of in vitro matured bovine oocytes. *Cryobiology*. 2001; 41: 69-73

HUANG, X; ZHUANG, P; ZHANG, L; YAO, Z; LIU, T; LIU, J; FENG, G ET AL. Effects of cryoprotectant toxicity on embryos of the Chinese Mitten Crab, *Eriocheir sinensis* (Decapoda brachyura). *Crustaceana*. 2011; 84(3): 281-291

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the Cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003; 46: 205-29.

HURTT, AE.; LANDIM-ALVARENGA, FC.; SEIDEL, JR; SQUIRES, EL. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open pulled straws. *Theriogenology*. 2000; 54: 119-128

IM, KS; KANG, JK.; K, HS. Effects of cumulus cells, different cryoprotectant, various maturation stages and pre-incubation before insemination on development capacity of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*. 1997; 47: 881-891

ISACHENKO, V; ALABART, J; DATTENA, M; NAWROTH, F; CAPPAL, P. New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology*. 2003; 59 (5-6), March: 1209-1218.

ISACHENKO V et al. Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. *Theriogenology*. 2003; 60: 445-452

ISHIMORI H; TAKAHASHI Y; KANAGAWA H. Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures. *Theriogenology*. 1992; 37: 481-487

IZQUIERDO D, VILLAMEDIANA P, PALOMO MJ, MOGAS T AND PARAMIO MT. Effect of sperm capacitation and fertilization media on IVF and early embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*. 1998; 49: 1501-1513.

KAIDI, S; DONNAY, I; VAN LANGENDONCKT, A. DESSY, F; MASSIP, A. Comparison of two co-culture systems to assess the survival of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification *Animal Reproduction Science*. 1998; 52 (1): 39-50

KAIDI, S; DONNAY, I; LAMBERT, P; DESSY, F; MASSIP, A. Osmotic Behavior of in Vitro Produced Bovine Blastocysts in Cryoprotectant Solutions as a Potential Predictive Test of Survival *Cryobiology*. 2000; 41(2): 106-115

KAIDI S ET AL. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. *Biology of Reproduction*. 2001; 65: 1127-1134

KLAUS, W Y ARPE, H. *Industrial organic chemistry: Important raw materials and intermediates*. Wiley-VCH. 2006: 45-46

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *En: Anim. Repr. Sci*. 1996; 42: 67-75

KASAI M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultrarapid vitrification. *Reproductive Medicine and Biology*. 2002; 1: 1-9

KASAI M, MUKAIDA T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod Biomed online*. 2004; 9: 164-170

KENNEDY JR. Biological effects of acetamide, formamide, and their monomethyl and dimethyl derivatives. *Crit. Rev. Toxicol*. 1986; 9: 129-182

KONG IK et al. Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology*. 2000; 53:1817-1826

KUWAYAMA, M; HAMANO, S; NAGAI, T. Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal reprod fertil*. 1992; 96: 187-193

LANE M; BAVISTER BD; LYONS EA; FOREST KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol*. 1999; 17: 1234-1236

LAOWTAMMATHRON C, LORTHONGPANICH C, KETUDAT-CAIRNS M, HOCHI S, PARNPAI R. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology*. 2005; 64:1185-1196

LANE, M; BAVISTER BD; LYONS, EA; FOREST, KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 1234–1236.

LAZAR L, SPAK J, DAVID V. The vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. *Theriogenology*. 2000; 54:571-578.

LEIBO SP, LOSKUTOFF NM. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*. 1993; 39:81- 94

LEIBO, SP; MARTINO, A; KOBAYASHI, S; PLLARD, JW. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Anim. Reprod. Sci.* 1996; 42: 45-53

LIEBERMANN, J ET AL. Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the flexipet denuding pipette. *Reproductive Biol Med Online.* 2002; 4: 146-150

LIEBERMANN, J; NAWROTH, F; ISACHENKO, V; ISACHENKO, E; RAHIMI, G; TUCKER, MJ. Potencial importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod.* 2002; 67: 1671-1680

LIEBERMANN J et al. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now?. *Reprod Biomed Online.* 2003; 7: 623-633

LIM, JM; FUKUI, Y; ONO, H. The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following ivm and fertilization. *Theriogenology.* 1991; 35: 1225-1235

LIM, JM.; FUKUI, Y; ONO, H. Developmental competence of bovine oocytes after cryopreservation by vitrification and in vitro fertilization. in: international congress of animal reproduction, 1992, The hague. *Proceedings The Hague.* 1992: 1421-1423.

LINDNER, G Y WRIGHT, RW. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology.* 1983; 20:407.

LAOWTAMMATHRON, C; LORTHONGPANICH, C, KETUDAT, M; HOCHI, S; PARNPAI, R. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid–albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology.* 2005; 64: 1185–1196

LOPATAROVA, M; CECH, S; HAVLICEK, L. Effect of Vitrification in Open Pulled Straws on Survival of Bovine Embryos from Superovulated Cows. *Acta Vet Brno.* 2002; 71: 93-99

LONG, CR; DAMIANI, P; PINTO-CORREIA, C; MACLEAN, RA; DUBY, RT; ROBL, JM. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 1994; 102: 361-369

LUSTER, SM. Cryopreservation of bovine and caprine oocytes by vitrification. A Thesis submitted to Graduate Faculty of the Louisiana State University University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in The Interdepartamental Program in Animal Sciences. 2004

MCGANN, LE. Differing actions of penetrating and non penetrating cryoprotecture agents. *cryobiology*, v.15, p.382-390, 1978.

MAGNUSSOM, V. Criopreservação de ovócitos bovinos pela vitrificação. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002: 43

MAHMOUDZADEH AR, VAN SOOM A, YSEBAERT MT, DE KRUIF A. Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of in vitro-produced cattle embryos. *Theriogenology*. 1994; 42:1389-1397.

MAHMOUDZADEH, AR; SAN SOOM, A.; BOLS, P; YSEBAERT, MT; DE KRUIF, A. Optmization 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. *Journ Reprod Fertil.* 1995; 103: 33-39

MAPLETOFT, R. Congelación y Vitrificación de Embriones Bovinos y Equinos. *Memorias VI Seminario Internacional de Reproducción en Grandes Animales.* 30 y 31 de mayo de 2008. Universidad de la Salle. 2008

MARKKULA, M., RATY, M, JAUHIAINEN, L, PARANKO, J, RAULA, J, MAKAREVICH, A. Ratio of proliferating cell nuclear antigen-positive nuclei to total cell number is higher in day 7 than in day 8 vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Biol Reprod.* 2001; 65: 52-59

MARTIN, F; LASOBRAS, M; L; DOMÍNGUEZ, J; GONZÁLEZ, E; ÁLVAREZ, I. Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reproductive BioMedicine*. 2008; 17(5): 652-661

MARTINEZ, AG; MATOS, DGD; FURNUS, DC; BROGLIATTI, GM. In vitro evaluation and pregnancy rates after vitrification of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*. 1998; 50: 757-767

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. Development in to blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. En: *Biol. Reprod*. 1996; 54, pp. 1059-1069

MARTINS, R.; COSTA, E.; CHAGAS, J.; IGNACIO, F. TORRES, C.; MCMANUS, C. Effects of vitrification of immature bovine oocytes on in vitro maturation. *Anim. Reprod*. 2005; 2 (2): 128-134.

MASSIP, A; VAN DER ZWALMAN, B; SCHEFFEN, F. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Lett*. 1986; 7: 270-273

MASSIP A.; MERMILLOD P.; DINNYES A. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Human Reproduction*. 1995; 10: 3004-3011

MASSIP A. Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. *Reprod Dom Anim*. 2001; 36: 49-55

MASSIP A. Cryopreservation of bovine oocytes: Current status and recent developments. Minireview. *Reprod. Nutr. Dev*. 2003; 43: 325-330

MATEUS, J; MARTINS, D; DA SILVA, OÑA, L; FERRARI, L; FERREIRA, J; ALVARENGA, F. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*. 2011; 75: 1211-1220

MAVRIDES, A. Y MORROLL, D. Cryopreservation of bovine oocytes: Is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete?. En: *Reprod. Nutr. Dev*. 2002; 42: 73-80

MEN, H.; AGCA, Y; CRITSER, ES; CRITSER, JK. Beneficial effects of serum supplementation during in vitro production of porcine embryos on their ability to survive cryopreservation by open pulled straw vitrification. *Theriogenology*. 2005; 64: 1340-1349

MEZZALIRA A ET AL. Vitricificação de óocitos bovinos em micropipetas de vidro. *Acta Sci Vet*. 1999; 27: 262

MEZZALIRA, A.; VIEIRA, AD; BARBIERI, DP.; MACHADO, MF.; THALER, NETO, A.; BERNARDI, ML.; SILVA, CAM; RUBIN, MIB. Vitrification of matured bovine oocytes treated with cytochalasin b. in: annual conference international embryo transfer society, 2002, foz do iguassu. *Proceedings foz do iguassu*, 2002: 472.

MEZZALIRA A, MEZZALIRA JC, MORAES AN. Vitrification of bovine embryos: Age of embryos and exposure time to cryoprotectant influences viability. *Arch Vet. Sci*. 2004; 9:107-111

MOLINA I.; CERVERA R.; DUQUE C.; ALFONSO J.; ROMEU A. Criopreservación de ovocitos humanos. Vitricificación vs. Congelación. *Rev Iber Fert*. 2004; 21(3) Mayo-Junio

MOORE K, RODRIGUEZ CJ, KRAMER JM, JOHNSON S, WROCLAWSKA E, GOICOA S AND NASARI A. In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development. Cryotolerance and survival to term. *Theriogenology*. 2007; 68:1316-1325

MUCCI, N, ALLER J, KAISER GG, HOZBOR F, CABODEVILA J, ALBERIO RH. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitricification. *Theriogenology* 2006; 65:1551-1562.

NAGASHIMA, H., KASHIWAZAKI, N., ASHMAN RJ., GRUPEN, CG., SEAMARK, RF, NOTTLE, MB. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol. Reprod* 1994; 51: 618-622

NEDAMBALE TL, DU F, YANG X, TIAN XC. Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with β - mercaptoethanol. *Anim Reprod Sci.* 2006; 93: 61-75

NEILD, DM; BROUWERS, JF; COLENBRANDER, B; AGUERO, A; GADELLA, BM . Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Mol Reprod and Devel.* 2005; 72: 230-238.

NIEMANN, H. AND WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology.* 2000; 53: 21-34.

OBERSTEIN, N; O'DONOVAN, MK; BRUEMMER, JE; SEIDEL JR; CARNEVALE, EM. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology.* 2001; 55: 607- 613

O'KEARNEY-FLYNN, M., WADE, M., DUFY, P., GATH, V., BOLAND, M.P., DOBRINSKY, J.R. Effect of cryopreservation on IVP cattle development in vitro and in vivo. *Theriogenology.* 1998; 49: 173

ORTEGA, L; GONZALEZ, L; MORRELL, JM; SALAZAR, C; MACIAS, B; RODRIGUEZ, H; TAPIA, J; PENA, F. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Society for Reproduction and Fertility.* 2009: 1741-1750 (online). Disponible en: www.reproduction-online.org

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; SUZUKI, T. In vitro fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved with ethylene glycol and sucrose. *Cryobiology.* 1995; 32: 455-460

OTOI T.; YAMAMOTO K.; KOYAMA N.; TACHIKAWA S.; SUZUKI T. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. *Cryobiology.* 1998; 37: 77-85

PALASZ, AT; MAPLETOF RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnology Advances.* 1996; 14: 127-149

PALASZ, AT, BREÑA, PB, MARTINEZ, MF, PEREZ-GARNELO SS, RAMIREZ MA, GUTIÉRREZ-ADÁN A, DE LA FUENTE J. Development molecular composition and freeze tolerance of bovine embryos cultured in TCM-199 supplemented with hyaluronan. *Zygote*. 2008; 16: 39-47

PAYNTER S. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Human Reproduction Update*. 2000; 6 (5); 449-456

PEREIRA, DC; DODE, MAN.; RUMPF, R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*. 2005; 63: 1131-1141

PEREIRA RM; MARQUES CC. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank*. 2008; 9:267-77

PICTON, H.; GOSDEN, R.; LEIBO, S. Cryopreservation of oocytes and ovarian tissue. Gamete source, manipulation and disposition. 2002

PUGH, PA, ANKERSMIT, AEL; MCGOWAN, LT, TERVIT, HR. Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos: effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post-thaw survival. *Theriogenology*. 1998; 50: 495-506

RALL WF, FAHY GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. 1985a; 313: 573-575

RALL, WF; FAHY, GM. Vitrification: a new approach to embryo cryopreservation. *Theriogenology*. 1985b; 23: 320

RENARD, JP; PRULIERE, G. Effects of organics solvents on the cytoskeleton of mammalian oocytes and embryos: implications for the cryopreservation of cells. *Cryobiology*. 1988; 25: 583-584

RIZOS, D; WARD, F.; BOLAND, MP; LONERGAN, P. Effect of culture system on the yield and quality of ovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology*. 2001; 56: 1-16

RIZOS, D., FAIR, T., PAPADOPOULOS, S., BOLAND, M. P. AND LONERGAN, P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol Reprod.* 2002; 62: 320-32

RIZOS, A; GUTIERREZ, A; PEREZ, S; DE LA FUENTE, J; BOLAND, MP AND LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod.* 2003; 68:236-243

ROA, N; LINARES, T Y TAMASAUKAS, R. Métodos y aplicaciones de la criopreservación de oocitos y embriones en bovinos y otros mamíferos. *Revista Científica FCV-LUZ.* 1998; 8(1): 40.52

RODRIGUEZ, P. Vitrificación de embriones bovinos producidos in vitro. VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba IRAC. 2009

RODRÍGUEZ, P; LOZANO D; BÓ G. Evaluación *in vitro* de la viabilidad de embriones bovinos producidos in vitro e in vivo criopreservados por los métodos de congelamiento convencional o vitrificación. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba IRAC. 2011

ROJANO, B; GAVIRIA, C; GIL, M; SAEZ, J; SCHINELLA, G; TOURNIER, H. Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Rev Fac Qca Farm.* 2008; 15 (1): 169-177

ROJANO, B; GAVIRIA C Y SAENZ, J. Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol. *Rev Fac Qca Farm.* 2008; 15(2): 212 – 218

SAHA S, SUZUKI T. Vitrification of in vitro produced bovine embryos at different ages using one- and three-step addition of cryoprotective additives. *Reprod. Fertil. Dev.* 1997; 9: 741-746

SANCHEZ, J; CUELLO, C; GIL, M; ALMINANA, C; PARRILLA, I; CABALLERO, I; GARCIA, E; VAZQUEZ, J. M; ROCA, J; MARTINEZ; EA. One-step dilution of OPS-vitrified porcine embryos at different developmental stage. *Reproduction in Domestic Animals*. 2006; 41: 305-306

SÁNCHEZ, J; CUELLO C; GIL MA; ALMIÑANA C; PARRILLA I; CABALLERO I; GARCÍA, EM; VÁZQUEZ JM; ROCA J; MARTÍNEZ EA. Factors affecting the success rate of porcine embryo vitrification by the Open Pulled Straw method. *Animal Reproduction Science*. 2008; 108: 334-344

SANTOS, RM ET AL. Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. *Ciencia Rural*. 2006; 36: 1501-1506

SARAGUSTY, J y ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*. 2011: 1-19

SAUNDERS, KM; PARKS, JE. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rates of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol Reprod*. 1999; 61: 178-187,

SCHNEIDER, U.; MAZUR, P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology*. 1984; 21: 68-79

SHAW, JM; KULESHOVA, LL; MACFARLANE, DR; TROUNSON, AO. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing ficoll, pvp, or dextran. *Cryobiology*. 1997; 35: 219-229

SHAW J. M.; JONES G. M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. En: *Hum Reprod Upd*. 2003: 9 (6): 583-605

SEIDEL, G Jr . Principles of cryopreservation of mammalian embryos. Techniques for freezing mammalian embryos. Short course proceedings. Fort Collins: Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University. 1986: 6

SEIDEL, G Jr. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*. 2006; 65: 228-235

SILVA M.; BERLAND A. Vitricación de blastocistos bovinos producidos in vitro con el método Open Pulled Straw (OPS): Primer reporte. *Arch. Med. Vet.* 2004; 36 (1)

SOMMERFELD V, NIEMANN H. Cryopreservation of Bovine in Vitro Produced Embryos Using Ethylene Glycol in Controlled Freezing or Vitrification. *Cryobiology*. 1999; 38: 95-105

SON, W.Y., YOON, S.H., YOON, H.J., LEE, S.M. AND LIM, J.H. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. *Hum Reprod*. 2003; 18: 137-139

STOREY, KB; STOREY, JM. Frozen and alive. *Sci. Am.* 1990; 263: 62-67

SZELL, A.; SHELTON, JN. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1986; 78: 699-703

TAKENAKA, M; HORIUCHI, T AND YANAGIMACHI, R. Effects of light on development of mammalian zygotes. *PNAS*. 2007; 104 (36): 14289-14293

TAMAYO, A; ZAPATA, S. Protocolo peroxidación lipídica. Laboratorio de Ciencia de los Alimentos. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

TAN J. Vitrification of Human Oocytes and Bovine Oocytes and Embryos. Selwyn House School. Quebec, Canada. 2004

THIBIER M. The animal embryo transfer industry in figures. *Embryo Transfer Newsletter*. 2001; 19:16-22

THIBIER M. A Contrasted year for the world activity of the animal embryo transfer industry. *Embryo Transfer newsletter*. 2002; 20:13-19

THIBIER M. More than half a million bovine embryos transferred in 2002. *Embryo Transfer Newsletter*. 2003; 21:12-19

THIBIER M. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world. Embryo Transfer Newsletter. 2004; 22: 12-19

THIBIER M. Significant increases in transfers of both in vivo derived and in vitro produced embryos in cattle and contrasted trends in other species in 2004. Embryo Transfer Newsletter. 2005; 23:17-22

THIBIER M. Transfers of both in vivo derived and in vitro produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. Embryo Transfer Newsletter. 2006 ; 24:12-18

THIBIER M. The worldwide activity in farm animals embryo transfer. Embryo Transfer Newsletter. 2007; 25: 4-9

TOMINAGA K, HAMADA Y. Gel-loading tip as container for vitrification of in vitro-produced bovine embryos. Journal of Reproduction and Development. 2001; 47: 267-273

WEISSERMEL, K Y ARPE, J. Industrial Organic Chemistry: Important Raw Materials and Intermediates. Wiley-VCP. 2006: 45-46

YAGI, K. In Lipids Peroxides in Biology and Medicine. Ed. K. Yagi. Academic Press, New York. 1982; 223- 242

YANG HW, HWANG KJ, KWON HC et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. Hum Reprod. 1998; 13: 998-1002.

YASSER, O; ASKAN, S; KONSTANTINOS, D; SAFAA AL, H. Vitrification: will it replace then conventional gamete cryopreservation techniques? Middle East Fertility Society Journal. 2005; 10(3): 171-184

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Direct in-straw rehydration after thawing of vitrified in vitro produced bovine blastocysts. Vet. Rec.1995; 137: 672

VAJTA G. Vitrification of bovine oocytes and embryos. Embryo Transfer Newsletter. 1997a; 15:12-8

VAJTA, G.; BOOTH, P.J.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-Lett* 1997b; 18: 191-195

VAJTA, G. Bovine in vitro embryo production, biopsy and cryopreservation Copenhagen, Denmark,. Tese (Ph D in Reproduction) - Royal Veterinary and Agricultural University. 1997c: 77p

VAJTA G, HOLM P, KUWAYAMA M, BOOTH PJ, JACOBSEN H, GREVE T; CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine oval and embryos. *Mol Reprod Dev.* 1998a; 51: 53-58

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification of cattle oocytes. *Theriogenology.* 1998b; 49: 176.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals (Abstract). *Anim Reprod Sci.* 2000a; 60-61: 357-364

VAJTA G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 2000b; 60-61: 357-64

VAJTA, G. Oocyte and embryo vitrification. *Reprod. Domest Anim. Suppl* 2000c: 45-48

VAJTA G, KUWAYAMA M. Improving Cryopreservation systems. *Theriogenology.* 2006a; 65: 236-24

VAJTA G, NAGY ZP. Are programable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproductive BioMedicine Online.* 2006b; 12: 779-796

VANDERZWALMEN, P ET AL. "In vitro" survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocyst after vitrification in an hemi-straw (HS) system. *Fertility and Sterility.* 2000; 74: 215-216

VANDERZWALMEN, P ET AL. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Human Reproduction*. 2002; 17:744-751

VARAGO, K; SALIBA, W; ALVIM, M; VASCONCELOS, A; OLIVEIRA, C; STAHLBERG, R; LAGARES, M. Vitrification of in vitro produced Zebu embryos. *Anim. Reprod Sci*. 2006; 3 (3): 353-358

VIANA J; CAMARGO, L. Bovine embryo production in Brazil: A new scenario. *Acta Sci Vet*. 2007; 35 (3): 915-924

VIEIRA, A.D.; RUBIN, M.I.B.; LEHMKUHL, R.C.; BARBIERI, D.P.; MEZZALIRA, A. Cryopreservation of immature bovine oocytes treated with Cytochalasin D and vitrified in OPS. In: Annual Conference International Embryo Transfer Society, 2002, Foz do Iguassu. Proceedings Foz do Iguassu. 2002: 488.

VIEIRA AD; FORELL F; FELTRIN C; RODRIGUES JL. Calves born after direct transfer of vitrified bovine in vitro produced blastocysts derived from vitrified immature oocytes. *Reprod Dom Anim*. 2008; 43: 314-318

VINCENT, C.; HEYMAN, Y.; GARNIER, V.; RENARD, J.P. Cryopreservation of ovulated rabbit oocytes: cryoprotectant effect on microfilament and microtubule organization. In vivo survival after freezing. *Cryobiology*. 1988; 25: 563

VINCENT, C.; PRULIERE, G.; PAJOT-AUGY, E. Effects of cryoprotectants on actin filaments during the cryopreservation of one-cell rabbit embryos. *Cryobiology*. 1990; 27: 9-23

VOLKEL SA, HU YX. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*. 1992; 37:23-37

WEISSERMEL, K; ARPE, H. Industrial Organic Chemistry: Important Raw Materials and Intermediates. Wiley-VCH. Ed Reverte. 2006; 45-46.

WOODS EJ et al. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*. 2004; 48: 146-156

WINKLER. Ficha de seguridad química Dimetilformamida. Disponible en www.winklerltda.com/ficha_new.php?id=1567

WOWK, B; DARWIN, M; HARRIS, S; RUSSELL, S Y RASCH, C. Effects of Solute Methoxylation on Glass-Forming Ability and Stability of Vitrification Solutions. Cryobiology. 1999; 39: 215-227

WOWK, B. Thermodynamic aspects of vitrification. Cryobiology. 2010; 60: 11-22

ZERON, Y., PEARL, M., BOROCHOV, A., ARAV, A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. Cryobiology. 1999; 38: 35-42