

TESIS DEFENDIDA POR
José Alberto Ramírez Tórrez
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Carmen G. Paniagua Chávez
Codirectora del Comité

Dra. Amelia Portillo López
Codirectora del Comité

Dr. José Alberto Fernández Zepeda
Miembro del Comité

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla
Miembro del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
*Coordinadora del Programa de
Posgrado en Acuicultura*

Dr. David Hilario Covarrubias
Rosales
Director de Estudios de Posgrado

25 de Febrero de 2011

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE
ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ACUICULTURA**

**ACTIVIDAD DE LA MAPK, ORGANIZACIÓN DEL HUSO MITÓTICO Y
CONDENSACIÓN DE LOS CROMOSOMAS EN OVOCITOS DE MOLUSCOS
DESPUÉS DE LA CRIOPRESERVACIÓN**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

JOSÉ ALBERTO RAMÍREZ TÓRREZ

Ensenada, Baja California, México, Febrero de 2011.

RESUMEN de la tesis de José Alberto Ramírez Torrez, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN ACUICULTURA. Ensenada, Baja California. Febrero de 2011.

**ACTIVIDAD DE LA MAPK, ORGANIZACIÓN DEL HUSO MITÓTICO Y
CONDENSACIÓN DE LOS CROMOSOMAS EN OVOCITOS DE MOLUSCOS
DESPUÉS DE LA CRIOPRESERVACIÓN**

Resumen aprobado por:

Dra. Carmen G. Paniagua Chávez
Codirectora de la Tesis

Dra. Amelia Portillo López
Codirectora de la Tesis

Muchos protocolos para la criopreservación de ovocitos necesitan ser optimizados debido a su complejidad celular. Para ello, entender el daño producido por la criopreservación en los ovocitos es de suma importancia. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la criopreservación en la actividad de la proteína MAPK, la evaluación de los microtúbulos y el estado de los cromosomas en ovocitos de ostión del Pacífico, *Crassostrea gigas*, y del abulón rojo, *Haliotis rufescens*, criopreservados bajo diferentes condiciones. Ovocitos de ostión fueron obtenidos directamente de la gónada y, previa selección del mejor crioprotector, se suspendieron alícuotas en etilen glicol (EG) 10%, sacarosa (S) 0.25M y la mezcla EG10% y S 0.25M para ser congeladas en popotes franceses (0.25 mL) de acuerdo a las especificaciones de Tervit *et al.* 2005. Para los experimentos con abulón, las hembras fueron desovadas. Los ovocitos fueron incubados en trehalosa (T) 0.2M o 0.4M por 20 min antes de ser colocados en popotes franceses de 0.25 mL y congelados con una tasa de congelación de tres pasos. El primer paso consistió en bajar la temperatura a 2°C/min hasta alcanzar los -8°C, inducir una nucleación por 10 min, continuar bajando la temperatura a 0.3°C/min hasta alcanzar los -30°C y terminar bajando la temperatura a 50°C/min hasta llegar a los -150°C. Los ovocitos de ambas especies fueron almacenados a -196°C. Para evaluar el daño debido a la criopreservación, muestras de cada especie y de los diferentes tratamientos fueron descongelados y alícuotas fueron preparadas para evaluar: la viabilidad por medio de una tinción fluorescente con FDA, el daño en los microtúbulos mediante inmunocitoquímica, condensación de cromosomas detectado por tinción fluorescente con DAPI, la actividad de la proteína MAPK utilizando la técnica de Western blot y la capacidad de los ovocitos descongelados para ser fertilizados. Los resultados indicaron que no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) en la viabilidad o la producción de larvas trocóforas de los ovocitos de ostión congelados en EG10% o la mezcla. El mayor porcentaje de husos no organizados (100%) fue encontrado en las muestras congeladas en S0.25M y la mezcla EG10% y S0.25M. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.001$) en la descondensación de los cromosomas. Comparado

con el control, todos los tratamientos tuvieron < 26% de ovocitos no condensados. La actividad de la proteína MAPK no fue afectada por el proceso de criopreservación. En el caso de la incubación de los ovocitos de abulón en los diferentes tratamientos, se encontró que los mejores tratamientos para los ovocitos incubados fueron por 20 min en 0.2M de trehalosa ($96 \pm 1\%$ de viabilidad) y para los ovocitos incubados por 10 min en 0.4 M de trehalosa ($98 \pm 1\%$ de viabilidad). Los ovocitos descongelados de abulón no fueron viables. Este trabajo demostró que se pueden obtener larvas trocóforas de ostión viables y que el criodaño a nivel celular fue evitado. Sin embargo, más investigación es necesaria para la criopreservación de ovocitos de abulón rojo ya que se demostró un criodaño físico a nivel de membrana y ultraestructura.

Palabras Clave: *Crassostrea gigas*, *Haliotis rufescens*, criopreservación, ovocitos, MAPK, huso mitótico, cromosomas

ABSTRACT of the thesis presented by José Alberto Ramírez Torrez as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in AQUACULTURE. Ensenada, Baja California, February, 2011.

THE MAPK ACTIVITY, MITOTIC SPINDLE STATUS, AND CHROMOSOME CONDENSATION FROM MOLLUSC OOCYTES AFTER CRYOPRESERVATION

The oocyte cryopreservation needs to be optimized due to their cellular complexity. Thus, to understand the cryoinjury produced in the oocytes at different levels is very important. The goal of this work was to determine the effect of the cryopreservation in the MAPK activity, the organization of microtubules and the state of chromosomes condensation in the oocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and red abalone, *Haliotis rufescens*, using different conditions. The oyster oocytes were obtained from the gonad, and previous selection of the best cryoprotectant, the oocytes were cryopreserved in ethylene glycol (EG) 10%, sucrose (S) 0.25M and its mixture (EG10% and S0.25M) in 0.25 mL French straws according to Tervit *et al.* 2005. Ripe abalones were induced to spawn. The oocytes were equilibrated in trehalose (T) 0.2M or 0.4M for 20 min before frozen in 0.25-mL French straws with a 3-step cooling rate. In the first step, the rate temperature was 2°C/min to -8°C. Nucleation was induced for 10 min at this temperature. In the next step the rate temperature was 0.3°C/min to -30°C. In the last step the rate temperature was 50°C/min to -150°C. Oocytes of the two species were stored in liquid nitrogen (-196°C). To evaluate the cryoinjury, samples of each species at the different treatments were thawed and aliquots were prepared to: evaluate the viability by fluorescent stain with FDA, assess the damage in the microtubules by immunocytochemistry and chromosomes condensation by fluorescent stain with DAPI and evaluate the MAPK activity using Western blot and capacity of the thawed oocytes to be fertilized. The results indicated that the viability of thawed oocytes or production of trochophore larvae of oyster oocytes frozen in EG10% or in the mixture were not significant different ($P > 0.05$). The highest percentage of non mitotic spindles (100%) was found in the samples frozen in S0.25M and the mixture EG10% and S0.25M. Significant differences ($P < 0.001$) were found in the chromosomes condensation. Compared with the control, all the treatments had $< 26\%$ of non condensed chromosomes. The activity of MAPK was not affected by the cryopreservation. For oocytes of red abalone, the best incubation treatments were: 0.2M of trehalose ($96 \pm 1\%$ of viability) equilibrated for 20 min and 0.4 M of trehalose ($98 \pm 1\%$ of viability) equilibrated for 10 min. Thawed abalone oocytes were not viable. This work showed that it is possible to obtain viable oyster trochophore larvae and that the cryoinjury could be avoided. However, more research is needed to cryopreserve oocytes of red abalone since physical cryoinjury was detected in the membrane and at ultrastructure level.

Keywords: *Crassostrea gigas*, *Haliotis rufescens*, cryopreservation, oocytes, MAPK, mitotic spindle, chromosome

Dedicatorias

Dedico este trabajo a mis padres.

A mi Amá Chela, por darme la vida, por enseñarme lo que esta significa, por su esfuerzo incansable, porque cada día de su vida que ha invertido en mí, puedan hacer realidad esas esperanzas y anhelos de darle lo mejor a su hijo. Por darme la capacidad de entender la vida. GRACIAS MI SHUNKA, GRACIAS JAY!!!!

A mi Apá Adal por ver que su hijo se ha convertido en un hombre que lo representará en una futura familia con los errores superados.

A mis hermanos: Rosalba, Rolando, Lourdes, Hugo y Ruthberí (en ese orden nacieron), a todos ellos por sus enseñanzas, experiencias, erros y sobre todo por sus aciertos.

A mis sobrinos, así como me fueron haciéndome tío: Claudio Jesús, Uxmal, Víctor Hugo, Fernanda, Jonathan, Christian y Andrés; a ellos que un día superaran esto.

A todos ellos, que son los que me mantienen con los pies en la tierra y que me hacen ver mis errores para poder superarlos.

...porque un día puedan venir al mundo tres pulgas ultratraviesas!!!!

CON TODO MI AMOR MUCHAS GRACIAS!!!!

Agradecimientos

A mi Directora de tesis Dra. Guadalupe sé que una persona como ella, pocos en este mundo; mi Codirectora Dra. Amelia hasta después entendí su manera de explicar las cosas; a mi asesor externo Dr. José Alberto, sé que lo confundía al grado que mejor no me decía nada y, al Dr. Miguel, sé que sólo era feliz cuando me regañaba durante los avances. Gracias por su interés, disposición, conocimiento, experiencias y profesionalismo, de verdad que aprendí de ustedes y sobre todo gracias por su infinita paciencia!!!!

A mis hermanos de maestría, se me olvidan sus nombres pero sé que por una u otra cosa no me olvidaran, malas ondas no me hablaban bien cuando iniciamos y SI, es reclamo jajajajaja.

A todos mis profesores, Dr. Eugenio, Dra. Marisabel, Dr. Manuel, Dr. Benjamín, Dra. Kukita, Dr. Miguel, Dra. Guadalupe, Dr. Abelardo, Dra. Rebeca.

A Sra. Ceci, Varuni, Bibiana, Ivis, Gisel, al personal de administración que son muy atentos en su trabajo y los que me ayudaron y los que no, también. Muchas Especiales gracias Don Fer por su apoyo, a Sintia Karina del Carmen por su amistad.

A todos aquellos que creían que era de doctorado, porque nada más no veían cuando iba a egresar de CICESE.

A CONACyT por haberme otorgado la beca para realizar la maestría.

A CICESE por cobijarme entre sus muros.

Sinceramente Muchas Gracias!!!!

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos.....	v
CONTENIDO	vi
LISTA DE FIGURAS.....	ix
I. Introducción	1
Capítulo II. Antecedentes.....	3
Capítulo III. Objetivos	8
III.1. Objetivo general	8
III. 1.1. Objetivos específicos	8
Capítulo IV. Materiales y Métodos	9
IV.1. Obtención de los organismos y los gametos	9
IV.1.1. Ostión del Pacífico, <i>Crassostrea gigas</i>	9
IV.1.2 Abulón rojo, <i>Haliotis rufescens</i>	10
IV.2 Determinación de la densidad de los gametos	11
IV.2.1 Ovocitos	11
IV.2.2 Espermatozoides.....	12
IV.3 Criopreservación de ovocitos del ostión de Pacífico <i>Crassostrea gigas</i>	12
IV.3.1 Evaluación del efecto de las soluciones crioprotectoras sobre los ovocitos del ostión del Pacífico.....	12
IV.3.1.1. Análisis estadístico	14
IV.3.2 Congelación.....	14
IV.4 Criopreservación de ovocitos del abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i>	15
IV.4.1. Evaluación del efecto de las soluciones crioprotectoras sobre los ovocitos del abulón rojo	15
IV.4 1.1 Análisis estadístico.....	16
IV.4.2 Congelación.....	16
IV.5 Evaluación de la capacidad de los ovocitos descongelados para ser fertilizados	17
IV.5.1. Fertilización de los ovocitos descongelados del ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i>	17
IV.5.1.1. Análisis estadístico	18

CONTENIDO (continuación)

IV.5.2. Fertilización de los ovocitos descongelados del abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i>	18
IV.6 Evaluación de la organización del huso y la condensación de los cromosomas en ovocitos <i>Crassostrea gigas</i> y <i>Haliotis rufescens</i>	18
IV.7 Detección de la actividad de la MAPK en ovocitos de <i>Crassostrea gigas</i> y <i>Haliotis rufescens</i>	20
IV.7.1 Inhibición de las fosfatasas.....	20
IV.7.2 Electroforesis.....	21
IV.7.3 Western blot	21
IV.8 Análisis estadístico	22
Capítulo V. Resultados.....	23
V.1. Determinación de la densidad de los gametos	23
Ovocitos.....	23
V.2. Criopreservación de los ovocitos del ostión del Pacífico, <i>Crassostrea gigas</i> ..	23
V.2.1. Efecto de las soluciones crioprotectoras sobre los ovocitos del ostión del Pacífico	23
V.2.2. Evaluación de la organización del huso y la condensación de los cromosomas en ovocitos equilibrados del ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> ..	26
V.2.3. Efecto de la criopreservación sobre la viabilidad de los ovocitos descongelados del ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i>	28
V.2.4. Evaluación de la organización del huso y la condensación de los cromosomas en ovocitos descongelados del ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i>	30
V.2.5. Evaluación de la actividad de la proteína MAPK en ovocitos incubados en los crioprotectores.....	32
V.2.6. Evaluación de la capacidad de los ovocitos descongelados para ser fertilizados	33
V.3. Criopreservación de los ovocitos del abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i>	35
V.3.1. Efecto de las soluciones crioprotectoras sobre los ovocitos del abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i>	35
V.3.2. Efecto de la criopreservación sobre la viabilidad de los ovocitos descongelados del abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i>	38
V.3.3. Evaluación de la organización del huso, la condensación de los cromosomas y actividad de la proteína MAPK en ovocitos descongelados del abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i>	38

CONTENIDO (continuación)

Capítulo VI. Discusión	42
VI.1 Criopreservación de los ovocitos del ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> ...	42
VI.2 Criopreservación de los ovocitos del abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i>	49
Capítulo VII. Conclusiones	52
Capítulo VIII. Recomendaciones	53
IX. Literatura citada.....	54
ANEXOS.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Porcentaje de viabilidad de ovocitos del ostión Pacífico, después de 20 min de exposición en las soluciones crioprotectoras. Ctrl: control; EG: etilen glicol; S: sacarosa. Pon las letras en donde corresponden y agrega la siguiente leyenda: Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha = 0.05$): $a > b > c$ etc.	24
2	Ovocitos del ostión del Pacífico <i>C. gigas</i> teñidos con FDA e incubados por 20 minutos en tres soluciones crioprotectoras. Las fotografías muestran las diferencias en intensidad de fluorescencia y cambio en la forma de los ovocitos. Las flechas rojas indican ovocitos rotos producida por la presión osmótica, que corresponden a ovocitos no viables.	25
3	Ovocitos del ostión del Pacífico, <i>C. gigas</i> , según la fase de organización del huso identificado con anticuerpos rojo fluorescente anti- α Tubulina (panel A) y condensación de los cromosomas después de ser teñidos con DAPI (panel B). En el panel A1 se observa un ovocito en profase sin huso organizado y en el panel A2 un ovocito en metafase con huso. El panel B1 muestra un ovocito profásico con la cromatina descondensada y el panel B2 a un ovocito metafásico con los cromosomas condensados. Las fotografías corresponden a los mismos ovocitos.	26
4	Ovocitos del ostión del Pacífico, <i>C. gigas</i> , con husos no organizados que corresponde a células profásicas equilibradas en los diferentes crioprotectores. Ctrl: control; EG: etilen glicol; S: sacarosa. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha = 0.05$): $a < b$	27
5	Ovocitos del ostión del Pacífico, <i>C. gigas</i> , con cromosomas sin condensación que corresponde a células profásicas equilibradas en los diferentes crioprotectores. Ctrl: control; EG: etilen glicol; S: sacarosa. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha = 0.05$): $a < b$	28

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
6	Porcentaje de viabilidad de ovocitos del ostión Pacífico después de la criopreservación. Ctrl: control; EG: etilen glicol; S: sacarosa. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha = 0.05$): $a > b$	29
7	Viabilidad de ovocitos del ostión del Pacífico, <i>C. gigas</i> , descongelados y teñidos con FDA. EG: etilen glicol; S: sacarosa.	30
8	Ovocitos de <i>C. gigas</i> con husos no organizados; que corresponde a ovocitos descongelados. Ctrl: control; EG: etilen glicol; S: sacarosa. Letras diferentes significan que existen diferencias entre los tratamientos. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha = 0.05$): $a < b$	31
9	Condensación de los cromosomas de ovocitos descongelados del ostión del Pacífico <i>C. gigas</i> . Ctrl: control; EG: etilen glicol; S: sacarosa. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha = 0.05$): $a > b$	32
10	Actividad de la MAPK en los ovocitos del ostión del Pacífico criopreservados en los diferentes tratamientos. EG: etilen glicol; S: sacarosa; Ctrl: ovocitos control; Des: ovocitos descongelados.	33
11	Fases de desarrollo después de la fertilización. Panel A y B, células en división a dos horas de la fertilización. Panel C y D, larvas trocóforas a 12 h después de haber realizado la fertilización.	33
12	Comportamiento de la capacidad de fertilización de ovocitos a dos horas de haber realizado la fecundación. Ctrl: control; EG: etilen glicol; S: sacarosa; F: fertilizados; NF: no fertilizados. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha = 0.05$): $a > b > c > d$	34

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
13	Producción de larvas trocóforas después de 12 h de haber realizado la fecundación. Ctrl: control; EG: etilen glicol; S: sacarosa; F: fertilizados; NF: no fertilizados. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha = 0.05$): a>b	35
14	Porcentaje de viabilidad de ovocitos del abulón rojo, <i>Haliotis rufescens</i> , después de haber sido incubados en Trehalosa 0.2 y 0.4 M: T, trehalosa. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba <i>a posteriori</i> de Tukey $\alpha = 0.05$): a>b>c	36
15	Ovocitos del abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i> teñidos con FDA e incubados por diferentes tiempos en dos soluciones crioprotectoras. Las fotografías muestran las diferencias en intensidad de fluorescencia. Las flechas indican los ovocitos rotos producida por la presión osmótica, que corresponden a ovocitos no viables.	37
16	Ovocitos descongelados de abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i> . Las fotografías muestran la condición en la que los ovocitos se observaron después de la descongelación. Paneles A y B ovocitos descongelados mostrando rupturas y con vitelo fuera de la membrana citoplasmática. Paneles C y D, ovocitos mostrando gránulos de lípidos. Panel E1 ovocito intacto. Panel E2, el mismo ovocito teñido con FDA. Panel F1 ovocito dañado. Panel F2, el mismo ovocito teñido con FDA, en todos los casos corresponden a ovocitos no viables. Las flechas indican gotas de lípidos.	40
17	Ovocitos descongelados de abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i> teñidos con DAPI. En todos los casos corresponden a ovocitos dañados. Paneles A y B ovocitos intactos. Paneles C y D ovocitos dañados. Las flechas sugieren cromosomas condensados en el panel A y cromosomas dispersos en el panel C.	41

I. Introducción

En los últimos años se ha tenido gran interés por la conservación de recursos génicos para utilizarse en diferentes programas de manejo de especies salvajes o en cautiverio (Holt, 2001) y en investigaciones biomédicas (James y Cohen, 2004). La criopreservación de células reproductivas (ovocitos y esperma) (Chen *et al.*, 1989; Chao y Liao, 2001; Ishikawa y Kaneko, 2007) y de otros tejidos tales como células sanguíneas (Lionetti y Hunt, 1976) cordón umbilical (Mugishima *et al.*, 1999), entre otros, es una tecnología en desarrollo que tiene tremendas implicaciones para el rápido avance de la investigación biomédica. Desde principios de los años 80's se ha estado trabajando para establecer las condiciones óptimas para la maduración de ovocitos, la fertilización *in vitro* y el cultivo de embriones. Estos sistemas de reproducción artificial han contribuido significativamente en los avances en la biotecnología reproductiva, ejemplo de ello es la utilización de células germinales descongeladas para la evaluación de las respuestas a diferentes tratamientos hormonales.

Aunque la criopreservación de embriones de varias especies de mamíferos (ratón, humanos y animales de granja) y de algunos invertebrados (ostiones) ha sido exitosa (Chao *et al.*, 1997, Chao y Liao, 2001), la criopreservación de ovocitos y de tejido ovárico de la mayoría de los mamíferos ha sido difícil debido a su extrema sensibilidad a las condiciones subóptimas durante el proceso de congelación (Picton *et al.*, 2002; Tervit *et al.*, 2005). La criopreservación del tejido ovárico y técnicas de trasplante han recibido mucha atención científica y pública debido a su gran potencial en el uso de tratamientos de infertilidad en humanos (Moos *et al.*, 1995; Picton *et al.*, 2002), en la conservación del potencial reproductivo de especies amenazadas y en el almacenamiento en bancos de

germoplasma de especies importantes para la producción de líneas o familias genéticamente mejoradas (Holt, 2001).

La criopreservación ha tenido una aplicación benéfica y ventajosa en el sector pecuario (Curry, 2007). Asimismo, la selección de caracteres deseables para el mejoramiento genético de las líneas de producción es ya una realidad en la acuicultura (Bromage y Roberts, 2001; Medeiros *et al.*, 2002; Dupré y Espinoza, 2004; Adams *et al.*, 2008). De esta manera, el almacenamiento prolongado de gametos permitiría realizar las cruzas con mayor facilidad y evitar las limitaciones temporales y geográficas (Odintsova *et al.*, 2001).

Por otra parte, debido a que es difícil realizar investigación sobre la infertilidad directamente en humanos, otras especies han servido como modelo. Los invertebrados marinos resultan ideales para realizar estudios de biotecnología reproductiva debido a la facilidad de su manejo y a la amplia disponibilidad de gametos. La criopreservación de ovocitos de ostión ha sido documentada en los últimos años y se ha mostrado un gran interés por la producción masiva de ovocitos descongelados. Hasta el momento se ha reportado un 50% de fertilización exitosa con ovocitos descongelados, pero la mayoría de los embriones no se desarrollan normalmente (Tervit *et al.*, 2005). Estos resultados no son diferentes a los encontrados en mamíferos. Actualmente se están llevando a cabo investigaciones a nivel molecular para evaluar los daños ocasionados a la célula por la criopreservación. Una de nuestras hipótesis planteadas es que la criopreservación de los gametos afecta a la cascada de MAPK. Esta proteína juega un papel primordial en la maduración de los óvulos, en la formación del huso acromático y en la diferenciación celular entre otros (Verlhac *et al.*, 1994). Por ello, este trabajo tiene como objetivo principal determinar el efecto de la criopreservación en la actividad de la proteína MAPK, la evaluación de los microtúbulos y el estado de los cromosomas en ovocitos de ostión y abulón criopreservados bajo diferentes condiciones.

Capítulo II. Antecedentes

La criopreservación es una metodología utilizada para la conservación de células reproductivas, con el propósito de almacenarlos por tiempos prolongados. Este procedimiento se conforma de siete pasos básicos: recolección de muestras, mantenimiento de las mismas en una solución fisiológica, verificación de la calidad, refrigeración (almacenamiento a corto plazo), congelamiento, descongelamiento y verificación de la viabilidad (Tiersch, 2000; Chao y Liao, 2001).

La criopreservación involucra la congelación, almacenamiento en nitrógeno líquido (-196°C), y la descongelación de gametos o tejidos, los cuales deben conservar su viabilidad una vez descongelados. A una temperatura de -196°C cualquier actividad celular se mantiene inactiva. Con ello la criopreservación se basa en el principio general de la conservación de la vida en congelación y detenida a través del tiempo. En un sentido más objetivo es mantener la integridad genética, la funcionalidad, detener la actividad metabólica y conservar la estructura física celular (Tiersch, 2000; Chao y Liao, 2001).

La criopreservación, como herramienta para conservar células por periodos prolongados, ha resultado útil (Adams *et al.*, 2008). Desafortunadamente al momento de la descongelación no se logra recuperar la totalidad de la muestra congelada. Ya que el proceso de criopreservación a menudo tiene efectos deletéreos sobre las células sometidas a congelación y más aún en células grandes (Paynter y Fuller, 2007). Uno de los efectos más dañinos durante la criopreservación es el rompimiento de las células debido a la formación de hielo (Tiersch, 2000). Considerando que el volumen de una célula está conformada de un 80% de agua, además del agua disponible en el medio en que se encuentren

suspendidas. La disminución de la temperatura durante la congelación implica obligadamente la formación de cristales de hielo, que cortarán todo material biológico que se encuentre en el medio congelado (Leibo, 2008). Una opción implementada en la criopreservación para evitar o disminuir la formación de hielo, es el uso de sustancias denominada crioprotectoras, tales como el glicerol y dimetilsulfóxido, como penetrantes y azúcares como: glucosa, trehalosa y sacarosa, como no penetrantes (Leslie *et al.*, 1995; Jain y Paulson, 2006). Estas sustancias tienen la función de disminuir la temperatura de congelación del medio en el que se encuentran suspendidas y así contrarrestar el efecto de la congelación (Woods *et al.*, 2004; Pegg, 2007). Los crioprotectores penetrantes tienen la desventaja de ser tóxicos a las células debido a la naturaleza de los compuestos (Rana, 1995). Asimismo, esta toxicidad se relaciona con la concentración del crioprotector y a la facilidad con que penetran al citosol (Pegg, 2007). Mientras que los crioprotectores no penetrantes, generalmente azúcares, generan daño por la deshidratación y la consiguiente constricción de las células. En ambos casos, la disolución de estos compuestos genera una alta presión osmótica que provoca el encogimiento y el estallamiento de las células suspendidas (McFradzen, 1995; Özkavukcu y Erdemli, 2002). De esta manera, un bajo peso molecular, una baja toxicidad y alta solubilidad en el agua son requerimientos obligados para la selección de un crioprotector (Chao y Liao, 2001; Pegg, 2007; Leibo, 2008).

Otro aspecto determinante a considerar en la criopreservación es la descongelación. De igual manera que la congelación también, tiene efectos adversos sobre las células. Si inicialmente, en la congelación, se evitó la formación de hielo al momento de la descongelación, también ocurre la formación de hielo con los mismos efectos que en la congelación (Woods *et al.*, 2004). Por lo que de igual manera es importante diseñar tasas de descongelación adecuadas (Chao y Liao, 2001 y Pegg, 2007). Estos efectos son observables y cuantificables al momento de descongelar las células.

Existen efectos que no son posibles detectar a simple vista. En este sentido, la criopreservación afecta diferentes estructuras subcelulares. Una de ellas son los cambios en la polarización de los lípidos por la disminución de la temperatura y desnaturalización de algunas proteínas (Zilli *et al.*, 2005), disminución de los procesos de difusión por la viscosidad del medio como consecuencia de la formación de cristales de hielo, desestabilización de la bicapa lipídica por la deshidratación y el choque térmico en el cambio de fase de líquido a sólido durante el proceso de congelación (de 10 a -16 °C), formación de burbujas de gas que dañan la membrana y el citoesqueleto, daños mecánicos a la membrana. En términos generales la disminución de la viabilidad celular (Chao y Liao, 2001; Özkavukcu y Erdemli, 2002).

La recuperación de células después de la criopreservación está asociada al número, el tamaño y la función. En células grandes como los ovocitos, la criopreservación tiene diversas implicaciones. Primero, los ovocitos son células de mayor tamaño, con ello, los efectos de la presión osmótica se incrementan, a diferencia de los espermatozoides (Chen *et al.*, 2003). La maduración de los ovocitos permite que tengan detenciones durante su proceso de maduración meiótica y éste se completa después de la fertilización en la mayoría de los organismos (Lodish *et al.*, 2008). La permeabilidad de los ovocitos se relaciona con las diferentes etapas de maduración por las que estos transcurren y a la especie en cuestión (Leibo, 2008). Considerando esto, resulta imperante seleccionar el número de ovocitos por contenedor y la fase de maduración en la que se encuentran al momento de congelarse (Watson y Fuller, 2001).

Los ovocitos tienen un periodo corto de vida, tiempo en el cual debe ocurrir la fertilización y desarrollarse en un organismo. De esta forma, un ovocito debe mantenerse estructural y funcionalmente viable. Una de las estructuras determinantes para que la formación de un nuevo organismo pueda ocurrir es el huso mitótico. El huso está formado por microtúbulos, que a su vez se constituyen

por microfilamentos compuestos por dímeros de α y β tubulina (Compton, 2000). El huso tiene el papel fundamental de segregar a los cromosomas homólogos durante la división celular por lo tanto, un daño por la criopreservación conlleva a una división celular errónea y al no desarrollo del organismo (Paynter y Fuller, 2007; Walczak y Heald, 2008). Además asociado a la criopreservación, está la disminución de la temperatura y la adición de compuestos crioprotectores, ambos provocan la despolimerización de los dímeros de tubulina (Watson y Fuller, 2001, Lodish *et al.*, 2008). Fenómeno que ocurre aproximadamente a los 4°C (Aman y Parks, 1994).

Otro de los efectos que puede tener la criopreservación es la degradación y desnaturalización de proteínas, debido a la formación de hielo, la alta concentración de solutos en el medio como resultado de la cristalización del agua y los cambios resultantes de pH (Chao Y Liao, 2001; Jain y Paulson, 2006). Por otro lado, la criopreservación puede afectar la expresión de los genes vitales para la maduración y división celular al momento de la descongelación y por ende no haber desarrollo después de la fecundación (Zilli *et al.*, 2005; Zilli *et al.*, 2008).

La respuesta celular al proceso de criopreservación está relacionada a cada tipo y fase de desarrollo celular. Por lo que la criopreservación implica necesariamente el desarrollo de protocolos para cada especie, tipo celular y fase de desarrollo específicos (Woods *et al.*, 2004; Pegg, 2007).

Durante el desarrollo de la criopreservación se han logrado grandes avances en la conservación de gametos masculinos de los cuales existen muchos casos exitosos en los que la disponibilidad de espermatozoides de diversas especies ya ha disminuido la dependencia temporal, tanto en la industria ganadera (Gravance *et al.*, 1998; Penfold y Watson, 2001), como en la acuícola (McFradzen, 1995; Gwo, 2000; Dupré y Espinoza, 2004; Di Matteo *et al.*, 2009). Sin embargo, para el caso de los ovocitos no prevalece la misma situación a pesar de que la criopreservación de ovocitos de ratón se logró en la década de los 70's (Watson y

Fuller, 2001). En la actualidad se han destinado grandes esfuerzos para la criopreservación de ovocitos humanos, en donde ya se han logrado avances significativos (Fabbri *et al.*, 2001; Bianchi *et al.*, 2005; Borini *et al.*, 2006). No obstante, aún no se han podido diseñar protocolos de criopreservación que garantice una recuperación superior al 50% de ovocitos y sobre todo que a partir de las células descongeladas se puedan producir embriones normales.

Pocos son los trabajos que se han realizado en otras especies, como es el caso de los organismos acuáticos (Hanquet-Dufour *et al.*, 2006). En años recientes se han llevado a cabo trabajos relacionados a la criopreservación de diversas especies acuáticas de embriones de esturión *Scophthalmus maximus* (Cabrita *et al.*, 2003), evaluación de la tolerancia osmótica de ovocitos del erizo de mar *Evechinus chloroticus* (Adams *et al.*, 2003), ovocitos de estrella de mar como modelo de estudio (Hamaratoğlu *et al.*, 2005) y células vesiculares de *C. gigas*, con el propósito de determinar las capacidades fisiológicas de esta especie después de la criopreservación (Hanquet-Dufour *et al.*, 2006). Estudios preliminares para la criopreservación del mejillón *Perna canaliculus* (Adams *et al.*, 2009) no han resultado exitosos. Hasta el momento, sólo existe un caso exitoso reportado, que corresponde a la criopreservación de los ovocitos de *C. gigas* por Tervit *et al.* (2005), quienes lograron producir 51% de larvas para el asentamiento a partir de ovocitos criopreservados.

En todos los casos mencionados generalmente la evaluación del éxito de la criopreservación se asocia a variables tales como la integridad estructural y viabilidad general de la célula en función de la integridad de la membrana, sin considerar aspectos subcelulares. En muchas ocasiones los ovocitos descongelados parecen viables, pero no se pueden fertilizar o producen embriones anormales. De esta manera, identificar el daño subcelular causado por la criopreservación representa una importante aportación para la optimización de los protocolos de criopreservación de ovocitos.

Capítulo III. Objetivos

III.1. Objetivo general

Evaluar el daño causado por la criopreservación en los ovocitos de moluscos.

III. 1.1. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la criopreservación sobre la organización del huso en ovocitos de moluscos.
- Evaluar el estado de organización de los cromosomas en ovocitos de moluscos después de la criopreservación.
- Detectar la actividad de la MAPK en ovocitos criopreservados.
- Evaluar la capacidad de fertilización de ovocitos descongelados.

Capítulo IV. Materiales y Métodos

IV.1. Obtención de los organismos y los gametos

IV.1.1. Ostión del Pacífico, *Crassostrea gigas*

Los individuos del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* se compraron en el mercado local (Ensenada, Baja California) en época reproductiva, la cual comprende los meses de mayo a septiembre. Todos los individuos se transportaron al Banco periférico del Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos (SUBNARGENA) en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B. C. (CICESE). Los organismos se mantuvieron en un refrigerador comercial a aproximadamente (~) 4°C, hasta el momento que se empezó a trabajar con ellos.

Primeramente, los animales se limpiaron con un cepillo y agua de mar para eliminar el lodo y epibiontes de la concha. Luego los animales se abrieron por el lado de la charnela y con un bisturí se cortó el músculo aductor sin dañar la gónada. En seguida se enjuagaron con agua de mar filtrada (AMF, 0.2 µm) para limpiar los restos de concha. A partir de una alícuota de la gónada de cada organismo, se identificó el sexo en un microscopio de campo claro (Olympus CX31[®]) con un amplificación de 4X.

Los organismos se separaron por sexo y los gametos se obtuvieron directamente de la gónada por raspado y aspiración con una pipeta Pasteur. Mientras se realizaba este procedimiento, los organismos se mantuvieron a 5°C en un refrigerador. Los gametos se extrajeron separados por individuo y se

suspendieron en AMF a $\sim 18^{\circ}\text{C}$ en un baño de agua con hielo (Allen y Bushek, 1992).

En el caso de los ovocitos, las muestras se lavaron 3 veces con AMF utilizando un tamiz de luz de malla de $35\ \mu\text{m}$. Después se centrifugaron en una centrifuga manual, con tubos de fondo cónico de 50 mL (Corning[®] LifeSciences, California, USA) para separar a los ovocitos de mucosa, restos de tejido somático y células dañadas. Una vez lavados los ovocitos, se procedió a mezclar en la misma proporción los gametos de cada una de las hembras. La muestra se mantuvo a $\sim 18^{\circ}\text{C}$ y se esperó 2.5 h antes de iniciar el experimento.

Para el esperma, las muestras se tamizaron 2 veces con un tamiz de luz de malla de $35\ \mu\text{m}$. Finalmente, las muestras de todos los organismos se mezclaron en un recipiente y conservadas en un refrigerador a $\sim 5^{\circ}\text{C}$ para después utilizarse en los experimentos de fertilización.

IV.1.2 Abulón rojo, *Haliotis rufescens*

Los abulones maduros se adquirieron de la compañía Abulones Cultivados, S. A. de C. V. ubicada en el Ejido Eréndira, Baja California ($30^{\circ}06'38.31''\text{N}$ $115^{\circ}47'20.70''\text{W}$) y se transportaron al Banco periférico del SUBNARGENA en el CICESE en bolsas de plástico saturadas con oxígeno contenidas en cajas de hule espuma y hielo para mantener la temperatura a $\sim 15^{\circ}\text{C}$. Los organismos se mantuvieron en un tanque con $\sim 50\ \text{L}$ de agua de mar natural, a una salinidad de $35\ \text{‰}$ y $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para su mantenimiento, se realizaron recambios del 50% del agua de mar cada dos días y los abulones se alimentaron *ad libitum* con la macroalga *Macrocystis pirifera*.

Para la obtención de los gametos, se eligieron tres hembras y tres machos maduros identificados por el color de la gónada verduzco-grisáceo de las hembras y amarillenta de los machos. Los individuos se colocaron en un recipiente de plástico con 5 L de AMF ($0.2\ \mu\text{M}$) a una temperatura de $\sim 18^{\circ}\text{C}$. La liberación de

gametos se indujo de acuerdo a la metodología descrita por Riffell *et al.* (2002). Brevemente, se adicionaron 6.6 mL/L de Tris 2 M al agua que contenía a los organismos y se dejaron reposar por 15 min. A continuación se agregaron 0.66 mL de H₂O₂ al 30% por litro de AMF. Después, el contenedor se tapó con una bolsa de plástico de color negro y se agitó frecuentemente para estimular a los organismos. El espermatozoides y los ovocitos fueron liberados de 2 a 3 h después de la adición del H₂O₂. En cuanto los organismos empezaron a liberar los gametos, éstos se removieron inmediatamente del contenedor, enjuagados con AMF y colocados rápidamente por separado en recipientes limpios conteniendo 50 mL de AMF para que terminaran la liberación de los gametos (Kopf *et al.*, 1983). Una vez obtenidos los gametos, éstos se limpiaron y mezclaron de igual manera que como se hizo con los ostiones y se mantuvieron en un refrigerador a ~5°C hasta su utilización.

IV.2 Determinación de la densidad de los gametos

IV.2.1 Ovocitos

Para realizar el conteo de los ovocitos del ostión, una alícuota de la muestra total de 250 mL, se diluyó 200 veces en AMF. A partir de ésta se obtuvo una alícuota de 10 µL y se colocó en una cámara Sedgewick- Rafter para iniciar el conteo, después de que la alícuota se dejó sedimentar en la cámara durante 5 min. Una vez conocida la densidad de la muestra total de los organismos muestreados, se procedió a ajustar la concentración de los ovocitos a una densidad de 2×10^6 por mL.

En el caso del abulón rojo se determinó la concentración total a partir del desove obtenido de las tres hembras. Para ello se obtuvo una alícuota de 20 µL de 250 mL de muestra total y se realizaron tres conteos, de donde se obtuvo el promedio de la concentración celular presente en la muestra de ovocitos. En este caso se trabajó con la densidad celular.

IV.2.2 Espermatozoides

En el caso de los espermatozoides, estos fueron fijados en formaldehído al 5.5% y se generó una dilución (1:1000). El conteo se realizó en una cámara de Neubauer. El número de células se calculó de acuerdo con la fórmula:

Número de células por mL = promedio de células contadas en 5 campos de la cámara \times FD \times 10, 000.

Dónde: FD es el factor de dilución (HausserScientific[®]; Torrentera Blanco y Tacon, 1989).

IV.3 Criopreservación de ovocitos del ostión de Pacífico *Crassostrea gigas*

Todos los materiales usados en la criopreservación se adquirieron de IMV Technologies[®] (IMV Technologies International Corp. Minneapolis, Minnesota) y los reactivos de Sigma-Aldrich[®] (California, USA).

IV.3.1 Evaluación del efecto de las soluciones crioprotectoras sobre los ovocitos del ostión del Pacífico

Todas las soluciones crioprotectoras se prepararon en agua destilada (dH₂O) al doble de la concentración final deseada y las soluciones crioprotectoras se agregaron a las muestras a \sim 6°C.

Se tomaron alícuotas de ovocitos y se suspendieron en las siguientes soluciones crioprotectoras: Etilen glicol (EG) al 10% (Tervit *et al.* 2005), sacarosa (0.25 M, 0.5 M, 0.75 M) y una mezcla EG10% y sacarosa en las mismas concentraciones descritas anteriormente. Los crioprotectores se agregaron lentamente en 10 pasos hasta llegar a una proporción 1:1 (ovocitos:crioprotector). El tiempo requerido para agregar los crioprotectores fue de 10 minutos. El tiempo de equilibrio total fue de 20 min y la concentración final de ovocitos en esta suspensión fue de 1×10^6 /mL. Después de la adición de los crioprotectores, los

ovocitos se tiñeron con 1 mg/mL (2.4 nM) en acetona de fluoresceína diacetato (FDA) en 900 μ L de muestra de ovocitos, para determinar la viabilidad de las células.

La viabilidad celular se definió de acuerdo al principio de tinción de la FDA. La viabilidad celular se infiere a partir de la hidrólisis de la FDA, donde la fluoresceína inicialmente unida al diacetato, se procesa por las esterasas y una vez liberada se acumula en el citoplasma. Cuando la molécula se encuentra libre, se excita con luz azul (450 nm) y emite fluorescencia verde (540 nm), la que finalmente se registra y basada en la actividad enzimática, se consideran células viables aquellas que muestran fluorescencia verde. Por lo contrario, las células no viables son incapaces de hidrolizar la FDA y al colocarlas bajo luz azul no es posible observar fluorescencia (Boender, 1984).

La FDA no muestra toxicidad sobre las células, por lo que la tinción se inició 10 min antes de que concluyera el tiempo de equilibrio. Inmediatamente, se tomaron alícuotas de 20 μ L, las cuales se visualizaron en un microscopio de epi-fluorescencia (Nikon[®] Eclipse80[®]) con un filtro de luz azul. En seguida se tomaron fotografías con una cámara digital (Evolution[®] VF, Media Cybernetics) montada en el microscopio y asistida por la paquetería de análisis de imágenes, Image Pro[®] Plus V 5.1 (Media Cybernetics[®]) para Windows[®]. La captura de las imágenes se realizó a 200 ms en todos los casos y la intensidad de la fluorescencia se utilizó como parámetro para determinar la viabilidad de los ovocitos. Se realizaron 3 conteos de 50 células cada uno en cada réplica. Para ello se tomaron 2 ó 3 fotografías para acumular 50 células por conteo realizado. En este mismo sentido, también se tomó en cuenta el efecto del crioprotector sobre la estructura esférica de los ovocitos. Para esto se hicieron tres conteos de 50 células cada una en cada réplica, discriminando entre células que conservaron su forma y las que no. De esta manera, se eligieron aquellos crioprotectores que conservaron la viabilidad y la estructura de los ovocitos. Todos los experimentos

se realizaron por triplicado y uno a la vez, para evitar que los ovocitos estuvieran más tiempo del que se propuso como tiempo de equilibrio.

IV.3.1.1. Análisis estadístico

A partir de los conteos, se obtuvieron datos porcentuales de viabilidad; éstos se normalizaron mediante la transformación al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción: $aseno\left(\sqrt{X_i/100}\right)$ antes de realizar el análisis estadístico. Se realizó un Análisis de Varianza de una vía (sacarosa en tres concentraciones y la mezcla de EG10% y sacarosa), para investigar si existía diferencia entre los crioprotectores utilizados. En caso de que existieran diferencias, se consideró un análisis de comparación de medias *a posteriori* Tukey, para detectar entre qué concentraciones se encontraban tales diferencias (Zar, 1999; Montgomery, 2001).

IV.3.2 Congelación

Después de haber realizado los ensayos de evaluación del efecto de las soluciones crioprotectoras, se seleccionó (ver criterios en el apartado IV.3.1) una concentración de sacarosa y otra de la mezcla de EG10% y sacarosa para criopreservar los ovocitos. Los crioprotectores se agregaron de acuerdo a la metodología descrita anteriormente. Después de la adición de los crioprotectores (10 min), se empezaron a llenar los popotes franceses con 0.25 mL de la muestra de ovocitos con la ayuda de una bomba de vacío (Cole-Parmer® Air Admiral). Los popotes se sellaron con gel sellador y se colocaron en contenedores para popotes (“globets”), los cuales fueron sujetados en las cañas de aluminio. Este procedimiento tardó ~10 min completándose así el tiempo de equilibrio requerido (20 min).

Una vez llenos los popotes, éstos se introdujeron en un congelador automático (PLANER plc®Kryo 560-16, UK) y las muestras se congelaron con una tasa de congelación de dos pasos de acuerdo a la metodología descrita por Tervit *et al.*

(2005). Primero, las muestras se incubaron a 0°C por 5 min, Después, la temperatura se disminuyó a una tasa constante de 1°C/min hasta alcanzar -10°C. Las muestras se mantuvieron a esta temperatura durante 5 min, momento en el cual se indujo la nucleación automática. El programa de congelación continuó a una tasa de 0.3°C/min hasta alcanzar los -35°C.

Al terminar la congelación, las muestras se almacenaron sumergidas en nitrógeno líquido a -196°C. Las muestras se mantuvieron en esta condición por 7 días y se descongelaron para su posterior análisis en un baño de agua a 28°C hasta no ver cristales de hielo en el popote. El tiempo máximo utilizado para realizar este procedimiento fue de 10 segundos.

IV.4 Criopreservación de ovocitos del abulón rojo *Haliotis rufescens*

IV.4.1. Evaluación del efecto de las soluciones crioprotectoras sobre los ovocitos del abulón rojo

Para el abulón rojo, se eligió un crioprotector no penetrante, el disacárido trehalosa en dos concentraciones (0.2 y 0.4 M). Los ovocitos se suspendieron en la trehalosa durante tres tiempos de equilibrio (10, 15 o 20 min). La adición del crioprotector se realizó en diez pasos hasta obtener una dilución 1:1 (ovocitos:crioprotector).

En este caso, la tinción con FDA se llevó a cabo de la siguiente manera: para el tiempo de equilibrio de 10 min la FDA se agregó al momento en que se adicionó la primera parte de la solución crioprotectora; en el caso del tiempo de exposición de 15 min, la FDA se añadió a partir de la adición de la quinta parte del crioprotector y para el caso del tiempo de equilibrio de 20 min, la FDA se adicionó cuando ya se habían agregado diez partes del crioprotector. De esta manera, las muestras se incubaron en FDA durante 10 min, tiempo requeridos para la tinción (Boender, 1984). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y uno a la vez, para

evitar que los ovocitos estuvieran más tiempo en el crioprotector del que se propuso como de equilibrio.

La evaluación de la viabilidad se determinó de acuerdo a la metodología antes mencionada utilizando FDA a partir del de tres conteos de 50 células cada una por triplicado. En este caso, el cambio en la forma de los ovocitos no fue considerado en la evaluación de viabilidad.

IV.4 1.1 Análisis estadístico

A partir de los conteos realizados se generaron valores porcentuales, los cuales se normalizaron mediante la transformación al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción: $aseno\left(\sqrt{X_i/100}\right)$. Se realizó un Análisis de Varianza de dos vías para determinar el efecto de las concentraciones de trehalosa y los tiempos de equilibrio considerados. En caso de que existiera alguna diferencia, se consideró un análisis de comparación de medias *a posteriori Tukey*, para detectar las diferencias (Zar, 1999; Montgomery, 2001).

IV.4.2 Congelación

La congelación de los ovocitos del abulón rojo se llevó a cabo en trehalosa 0.4 M, con un tiempo de equilibrio de 20 min, al concluir este tiempo las muestras se aspiraron en popotes franceses de 0.5 mL. La congelación se realizó en un congelador programable (PLANER plc®Kryo 560-16, UK) de acuerdo a la metodología desarrollada por Borini *et al.* (2006) modificado en la temperatura de inicio y el método de nucleación. La temperatura inicial fue de 15°C y en el primer paso la temperatura se bajó a una tasa de 2°C/min hasta alcanzar los -8°C. En esta temperatura se indujo la nucleación automática durante 10 min. En el segundo paso la temperatura se disminuyó a una tasa de 0.3°C/min hasta alcanzar los -30°C. El último paso se realizó con una tasa de congelación de

50°C/min hasta llegar a los -150°C. Finalmente, las muestras se colocaron en tanques de nitrógeno líquido.

Se utilizaron cinco métodos de descongelación para determinar el procedimiento óptimo para los ovocitos de abulón rojo.

El primero consistió en utilizar el procedimiento propuesto por Borini *et. al.* (2006), el cual consiste en mantener las muestras durante 30 s a temperatura ambiente y luego colocarlas en un baño de agua a 30°C por 40 s. El segundo método consistió en sumergir los popotes en el baño de agua a 30°C por 40 s. En el tercer método las muestras se sumergieron en un baño de agua a 50°C por 13 s. En cuarto método, las muestras se sumergieron en un baño de agua a 60°C por 10 s. Finalmente, las muestras se descongelaron sumergiendo los popotes en un baño de agua a 70°C durante 13 y 9 s.

Después de la descongelación, las células se observaron al microscopio para determinar cuál fue su estado inmediatamente después de la descongelación y en caso de que no hubieran sufrido daño se continuaría con la dilución.

IV.5 Evaluación de la capacidad de los ovocitos descongelados para ser fertilizados

IV.5.1. Fertilización de los ovocitos descongelados del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*

Después de la descongelación, los ovocitos se suspendieron en 100 mL de AMF a una densidad de 1000 ovocitos por mL y se agregó una suspensión de espermatozoides frescos provenientes de dos machos a una proporción de 1 ovocito:100 espermatozoides. Después de 10 min los ovocitos se transfirieron a un recipiente conteniendo 1 L de AMF donde se dejaron incubar por 19 h a ~20°C hasta observar larvas trocóforas. El experimento se realizó por triplicado y los ovocitos frescos se utilizaron como control (Song *et al.*, 2009).

IV.5.1.1. Análisis estadístico

Se realizaron tres conteos a las 2 y a las 12 h después de haber realizado la fertilización en cada tratamiento y réplica, a partir de los cuales se generaron valores porcentuales. Estos valores se normalizaron mediante la transformación al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción: $aseño\left(\sqrt{(X_i/100)}\right)$. Se realizó un análisis de una vía para determinar el efecto de la criopreservación sobre el porcentaje de fertilización de los ovocitos descongelados, en caso de que existieran diferencias entre los tratamientos y el control, se tomó en cuenta un análisis de comparación de medias *a posteriori* Tukey, para averiguar entre qué tratamientos se encontraban tales diferencias (Zar, 1999; Montgomery, 2001).

IV.5.2. Fertilización de los ovocitos descongelados del abulón rojo *Haliotis rufescens*

Los ovocitos descongelados se colocaron en un recipiente conteniendo 100 mL de AMF a una densidad de 15 ovocitos por mL. Los ovocitos se fertilizaron con espermatozoides frescos a una proporción de 1 ovocito: 100 espermatozoides. Después de 10 min de realizada la fertilización, los ovocitos se transfirieron a otro recipiente que contenía 1 L de AMF donde se dejaron incubar por 19 h a $\sim 18^{\circ}\text{C}$ hasta observar larvas trocóforas. El experimento se realizó por triplicado y se utilizaron ovocitos frescos como control (Leighton, 2000).

IV.6 Evaluación de la organización del huso y la condensación de los cromosomas en ovocitos *Crassostrea gigas* y *Haliotis rufescens*

Las muestras estuvieron guardadas durante una semana antes de realizar la evaluación de la organización del huso. La evaluación del estado de organización del huso mitótico se realizó en los controles, muestras equilibradas (incubadas en los crioprotectores antes de su congelación) y en muestras descongeladas.

Las muestras (0.5 mL) de ovocitos de ostión se centrifugaron en una centrifuga manual por 10 s y sin compactar el botón celular (para no romper los ovocitos) para eliminar el AMF de los ovocitos frescos o el crioprotector de las muestras equilibradas o descongeladas. Al botón de células se le agregó la solución fijadora (metanol 50%, EGTA 50 mM a pH 6.8). Estas muestras se almacenaron a -20°C por un periodo de 7 días. En el caso de las muestras de abulón, no se pudieron centrifugar los ovocitos suspendidos en la solución crioprotectora, así que el fijador se agregó directamente a la muestra para sustituir la solución crioprotectora. (Stephano y Gould, 2000; Semenova y Rodionov, 2007).

Para la evaluación, las muestras se sacaron del congelador y se dejaron a temperatura ambiente durante 5 min. En seguida se lavaron dos veces con el amortiguador TRIS salino (TS: 140 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 6.8). A continuación los ovocitos se bloquearon con la solución de suero de albumina de bovino al 1% (BSA1%, por sus siglas en inglés) en TS durante 1 h a 37°C . Después de la incubación, los ovocitos se lavaron nuevamente dos veces con TS.

En seguida, los ovocitos se incubaron con el primer anticuerpo anti α -tubulina en TS con 1% de BSA, (Anti α -tubulina de Bovino, anticuerpo monoclonal de ratón, A-11126, Molecular Probes[®], California, USA), durante 1h a 37°C . Al final de este tiempo los ovocitos se lavaron dos veces en TS. Inmediatamente, las células se incubaron 0.5-1 h a 37°C con el segundo anticuerpo, anti IgG de ratón (Chivo anti IgG de ratón, Alexa Fluor[®] 546, INVITROGEN[®], California, USA) en TS 1:20 y 1 % de BSA. Finalmente, las muestras se lavaron dos veces con TS.

Para observar el estado de los cromosomas y relacionarlo con el estado del huso, se realizó un contrateñido con DAPI; para ello las células se mantuvieron en TS y se les agregó 50 μL de una solución de DAPI (2.2 μM), la muestra se incubó durante 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Por último, la muestra se lavó dos veces en TS, para eliminar el exceso de DAPI (Sunet *al.*, 2001). Las

muestras se mantuvieron suspendidas en TS y se analizaron, montadas en un portaobjetos sin cubreobjetos, en un microscopio de epifluorescencia a 550 nm (huso) y 350 nm (DAPI).

La visualización, conteo y la obtención de fotografías de las células se realizaron en un microscopio de epi-fluorescencia (Nikon[®] ECLIPSE 80*i*), con un filtro de luz verde para observar el huso y con un filtro de luz ultravioleta para la visualización de los cromosomas, en la misma célula. Para la obtención de las fotografías se usó una cámara digital (Evolution[®] VF, Media Cybernetics) montada en el microscopio, asistida por la paquetería de análisis de imágenes, Image Pro[®] Plus V 5.1 (Media Cybernetics[®]) para Windows[®].

IV.7 Detección de la actividad de la MAPK en ovocitos de *Crassostrea gigas* y *Haliotis rufescens*

IV.7.1 Inhibición de las fosfatasas

Se tomaron 25 μ L de muestra de cada tratamiento y tres réplicas; éstas se centrifugaron a 14 000 rpm durante 10 s (Microfuge[®] 11, Beckam), en este caso no se diluyó el crioprotector, porque de esta manera se pudo generar el botón celular y no era necesario conservar intactos los ovocitos, finalmente se descartó el sobrenadante. En seguida se agregaron 5 μ L del coctel inhibidor de fosfatasas (100 mM β -glicerofosfato, 4 mMNaF, 2 mM Na₃VO₄) y a continuación 25 μ L del amortiguador de muestra (SGB, siglas en inglés; 2.5 mL, glicerol 1 mL, 2-mercaptoetanol (ME) 0.5 mL, 10% de dodecil sulfato de sodio (SDS) 3.2 mL, 0.001% de azul de bromofenol). Al agregar cada solución se mezcló la muestra con la misma punta de la micropipeta de cada solución añadida. Estas muestras se almacenaron a -20°C, en un congelador hasta el momento de realizar el análisis.

IV.7.2 Electroforesis

Las muestras anteriormente conservadas a -20°C , se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 30s a 14 000 rpm; de ellas se usaron 10 μL del sobrenadante a partir de cada tratamiento y réplica. Las alícuotas se colocaron en los pozos del gel de acrilamida/bisacrilamida, 30 %/0.86 % v/v. Las alícuotas se colocaron en el siguiente orden de izquierda a derecha, el estándar de proteínas (Bio-Rad[®], California, USA), en seguida tres réplicas de las muestras control, a continuación tres réplicas de las muestras incubadas en los crioprotectores y, finalmente las tres réplicas de las muestras descongeladas. La electroforesis se llevó a cabo a 120 V durante ~2 h (Walker, 1996).

IV.7.3 Western blot

La transferencia de las proteínas se efectuó en una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en ingles. GE[®], Osmotics). Este procedimiento se realizó a 100V durante 1h. En seguida la membrana se enjuagó con el amortiguador Tris-base salino con Tween (TBST, Tris-base 1 M, NaCl 4.84 M) durante 10 min. Posteriormente, la membrada se bloqueó con una solución de 5% de leche en polvo baja en grasas (Carnation, Nestle[®]) en TBST a 4°C durante 12 h sin agitación. Después de esto, la membrana se colocó en 10 ml de una preparación fresca de leche/TBST con 8 μL del anticuerpo monoclonal anti-fosfo p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204, Cell Signaling Technology[®], Massachusetts, USA) (dilución 1:1250), durante 18 h a 4°C con agitación constante, al término de este tiempo la membrana se lavó tres veces con TBST a intervalos de 15 min. A continuación, la membrana se incubó en 10 ml de TBS con 4 μL del segundo anticuerpo (dilución 1:2500), anti conejo IgG conjugado con peroxidasa (#7074, Cell Signaling Technology[®], Massachusetts, USA) en TBST, por un periodo de 1h a temperatura ambiente, con agitación. Enseguida la membrana se lavó tres veces con 25 ml de TBST por espacio de 15 minutos. Posteriormente la membrana se

escurrió y se colocó en un plástico de envoltura y se adicionaron 10 ml del sustrato luminiscente ECL (Amersham, GE[®], UK), se dejó reaccionar por 3 minutos, se escurrió y se colocó rápidamente en otro plástico limpio para envolverse. Finalmente la membrana se colocó en un casete radiográfico para exponerse a una película fotográfica por intervalos de 15 - 30 segundos y 1 minuto. Después se procedió a revelar la película.

IV.8 Análisis estadístico

A partir de tres conteos, de 50 ovocitos cada uno, se obtuvieron datos porcentuales, de la exposición de los ovocitos a las soluciones crioprotectoras antes de congelarlos, de la organización del huso (profase y metafase) y la condensación de los cromosomas (condensados y no condensados). Estos valores se normalizaron mediante la transformación al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción: $aseño\left(\sqrt{(X_i/100)}\right)$ antes de realizar el análisis estadístico. Se realizó un Análisis de Varianza de una vía para cada tratamiento en cada variable cuantificada, para investigar si existía diferencia entre los crioprotectores utilizados, en cuanto a la viabilidad de los ovocitos, la organización del huso y la condensación de los cromosomas. En caso de que existieran diferencias, se consideró un análisis de comparación de medias *a posteriori* Tukey, para detectar entre que tratamientos se encontraban tales diferencias (Zar, 1999; Montgomery, 2001).

Todos las pruebas estadísticas efectuadas se llevaron a cabo en el paquete estadístico STATISTICA v 7. (StatSoft[®]).

Capítulo V. Resultados

V.1. Determinación de la densidad de los gametos

Ovocitos

En el caso del ostión del Pacífico se obtuvo un máximo de 6.7×10^5 ovocitos por mL y un mínimo de 5.5×10^5 ovocitos por mL. Para el abulón rojo, se obtuvo un máximo de 1600 ovocitos por mL.

Espermatozoides

Para el ostión del Pacífico se obtuvo un promedio 4.1×10^6 espermatozoides por mL y para el abulón rojo no se indujo al desove de los machos, porque no se realizaron ensayos de fertilización.

V.2. Criopreservación de los ovocitos del ostión del Pacífico, *Crassostrea gigas*

V.2.1. Efecto de las soluciones crioprotectoras sobre los ovocitos del ostión del Pacífico

Los mejores tratamientos, comparados con el control, fueron EG10% con un $96\% \pm 1$ de ovocitos viables después de 20 min de incubación, sacarosa 0.25 M con un $87\% \pm 0.8$ de ovocitos viables y la mezcla de EG10% y S 0.25 M con un $91\% \pm 0.9$ de ovocitos viables (Figura 1 y 2). De acuerdo a estos resultados se seleccionaron para la criopreservación de los ovocitos las soluciones crioprotectoras EG10%, 0.25 S y la mezcla de EG10% y S0.25M. El análisis estadístico entre las diferentes concentraciones de sacarosa y las mezclas, mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) en los diferentes tratamientos utilizados.

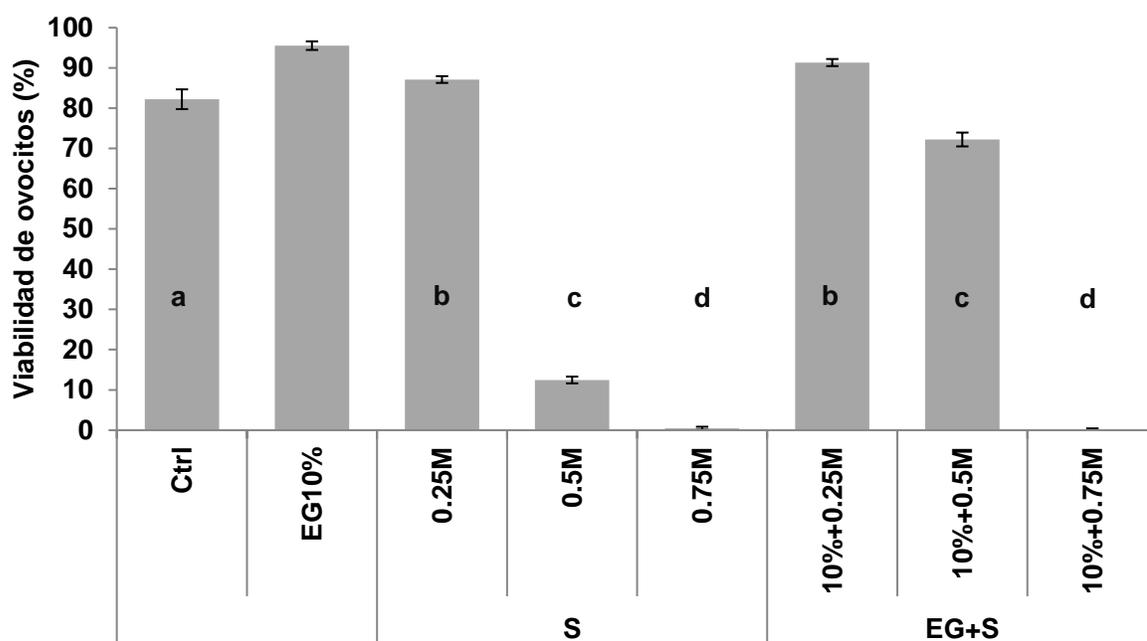


Figura 1. Porcentaje de viabilidad de ovocitos del ostión Pacífico, después de 20 min de exposición en las soluciones crioprotectoras. Ctrl: control; EG: etilen glicol; S: sacarosa. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha = 0.05$): $a > b > c$ etc.

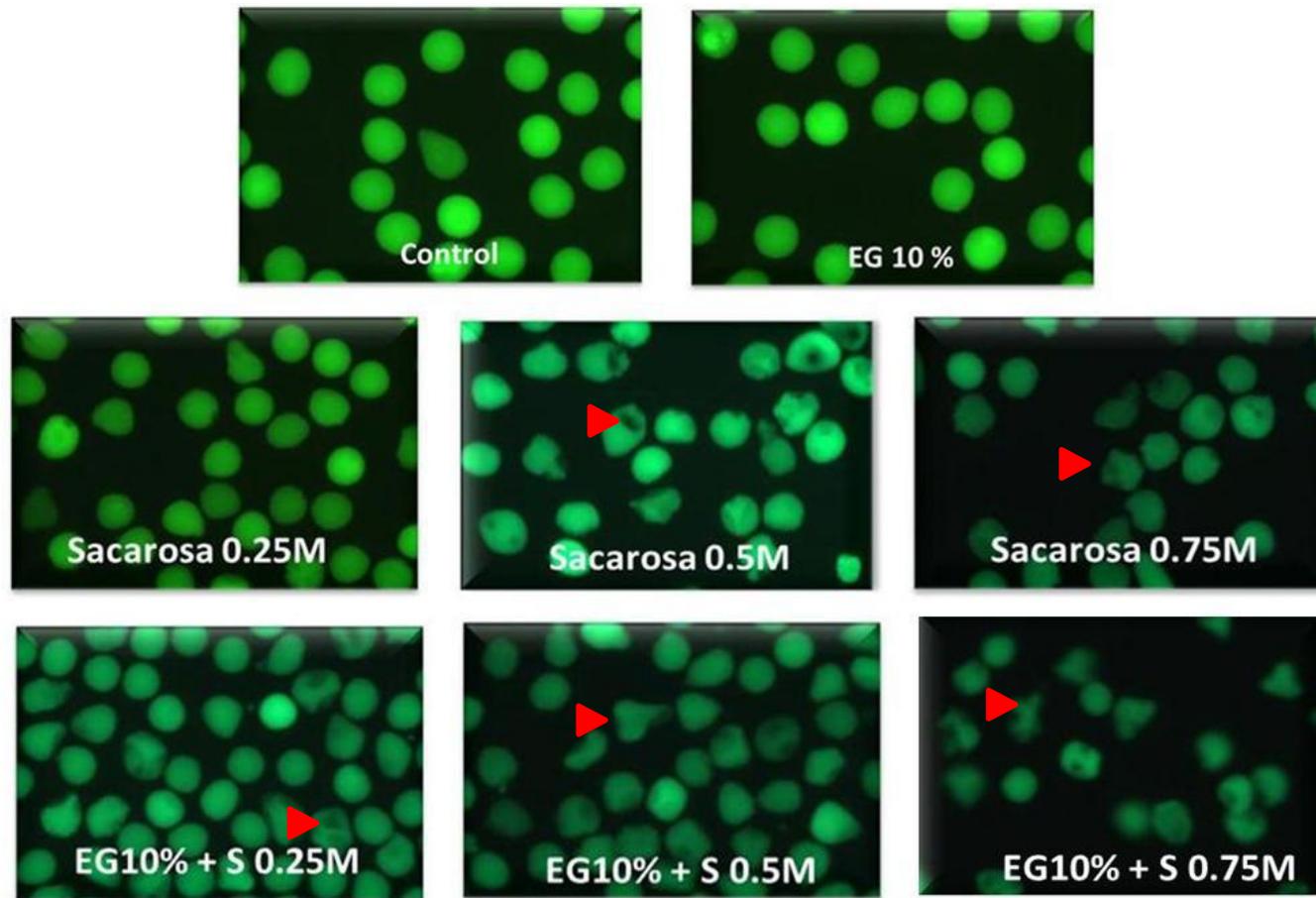


Figura 2. Ovocitos del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* teñidos con FDA e incubados por 20 minutos en tres soluciones crioprotectoras. Las fotografías muestran las diferencias en intensidad de fluorescencia y cambio en la forma de los ovocitos. Las flechas rojas indican ovocitos rotos producidos probablemente por la presión osmótica, que corresponden a ovocitos no viable.

V.2.2. Evaluación de la organización del huso y la condensación de los cromosomas en ovocitos equilibrados del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*

Se observaron ovocitos profásicos y metafásicos en las células de los controles de acuerdo a la fase de la organización del huso y la condensación de los cromosomas (Figura 3). Los ovocitos que se encontraban en profase y que presentaban la vesícula germinal no mostraron el huso organizado con la tinción mediante la tinción fluorescente anti- α Tubulina. Sin embargo, se pudieron observar puntos brillantes que sugieren la presencia de monómeros de tubulina sin polimerizar (Figura 3, panel A1), al mismo tiempo esto se corroboró con la tinción de los cromosomas usando DAPI donde los cromosomas se encontraban descondensados (Figura 3, panel B1). Contrario a lo que se observó en ovocitos metafásicos, donde el huso fue observable con claridad (Figura 3, panel A2) y los cromosomas teñidos con DAPI, se observaron condensados (Figura, panel 3 B2).

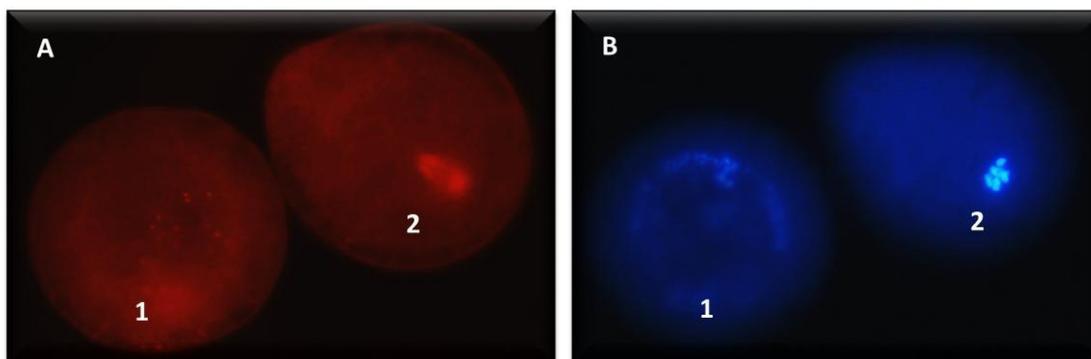


Figura 3. Ovocitos del ostión del Pacífico, *C. gigas*, según la fase de organización del huso identificado con anticuerpos rojo fluorescente anti- α Tubulina (panel A) y condensación de los cromosomas después de ser teñidos con DAPI (panel B). En el panel A1 se observa un ovocito en profase sin huso organizado y en el panel A2 un ovocito en metafase con huso. El panel B1 muestra un ovocitoprofásico con la cromatina descondensada y el panel B2 a un ovocitometafásico con los cromosomas condensados. Las fotografías corresponden a los mismos ovocitos.

En cuanto a la organización del huso en los tratamientos escogidos para su congelación, se encontró que las muestras incubadas por 20 min en EG10% tuvieron el más bajo porcentaje de ovocitos ($64\% \pm 3$) profásicos, mientras que en las muestras donde se agregó la sacarosa como aditivo mantuvieron $>84\%$ de ovocitos profásicos (Figura 4).

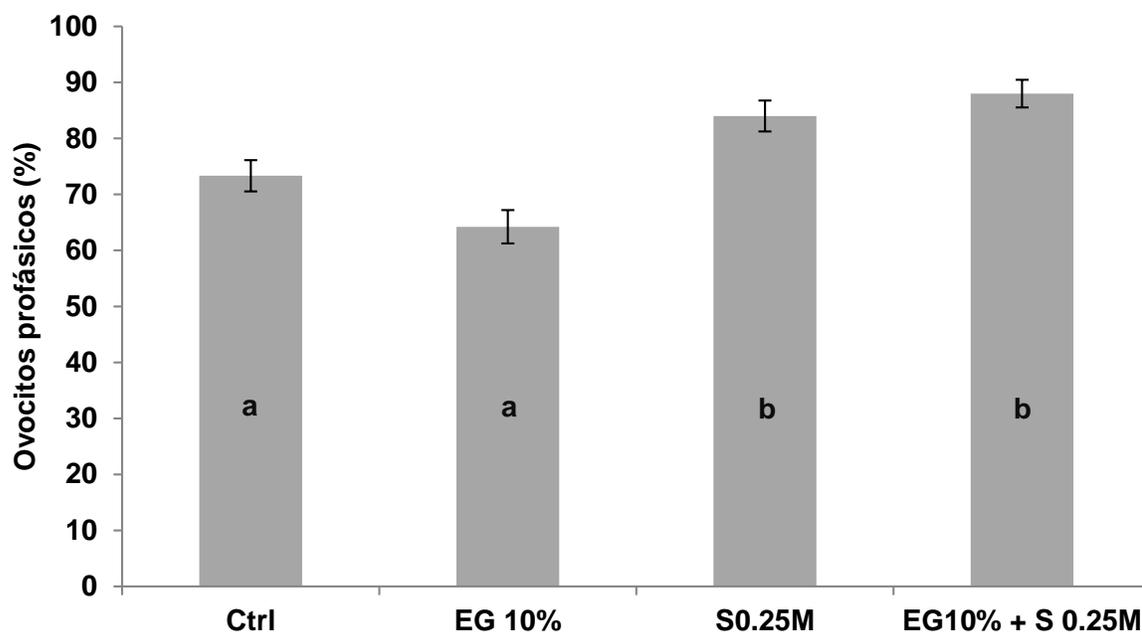


Figura 4. Ovocitos del ostión del Pacífico, *C. gigas*, con husos no organizados que corresponde a células profásicas equilibradas en los diferentes crioprotectores. Ctrl: control; EG: etilen glicol; S: sacarosa. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha = 0.05$): $a < b$

Con respecto a la condensación de los cromosomas, al igual que la organización del huso, se encontró que las muestras incubadas por 20 min en EG10% tuvieron el más bajo porcentaje de ovocitos ($64\% \pm 3$) profásicos o con cromosomas condensados, mientras que en las muestras donde se agregó la sacarosa como aditivo mantuvieron $>84\%$ de ovocitos profásicos (Figura 5). Los análisis estadísticos tanto para organización del huso y condensación de los cromosomas mostraron diferencias significativas ($P < 0.001$).

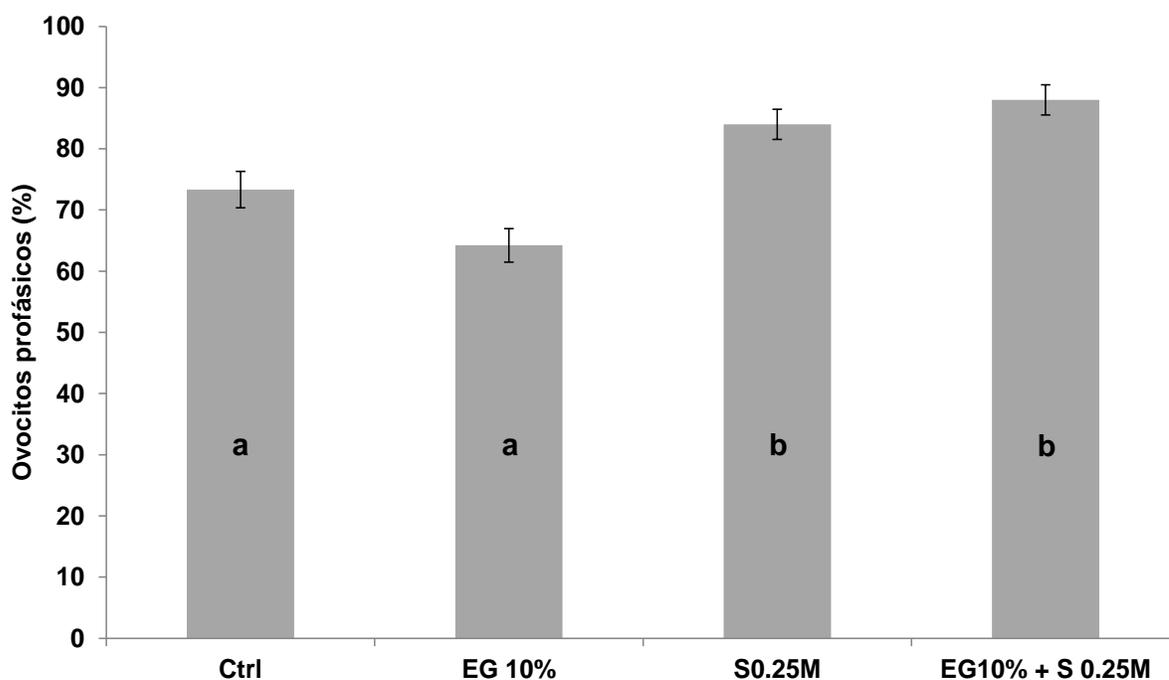


Figura 5. Ovocitos del ostión del Pacífico, *C. gigas*, con cromosomas sin condensación que corresponde a células profásicas equilibradas en los diferentes crioprotectores. Ctrl: control; EG: etilen glicol; S: sacarosa. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha = 0.05$): $a < b$

V.2.3. Efecto de la criopreservación sobre la viabilidad de los ovocitos descongelados del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.001$). El análisis *a posteriori* indica que el tratamiento de S0.25M fue diferente a los demás tratamientos y que no hubo diferencias significativas entre el control, el EG10% y la mezcla de EG10% y S0.25 M ($P > 0.05$). La viabilidad de estos ovocitos después de haber sido descongelados fue $>82\%$. (Figura 6 y 7)

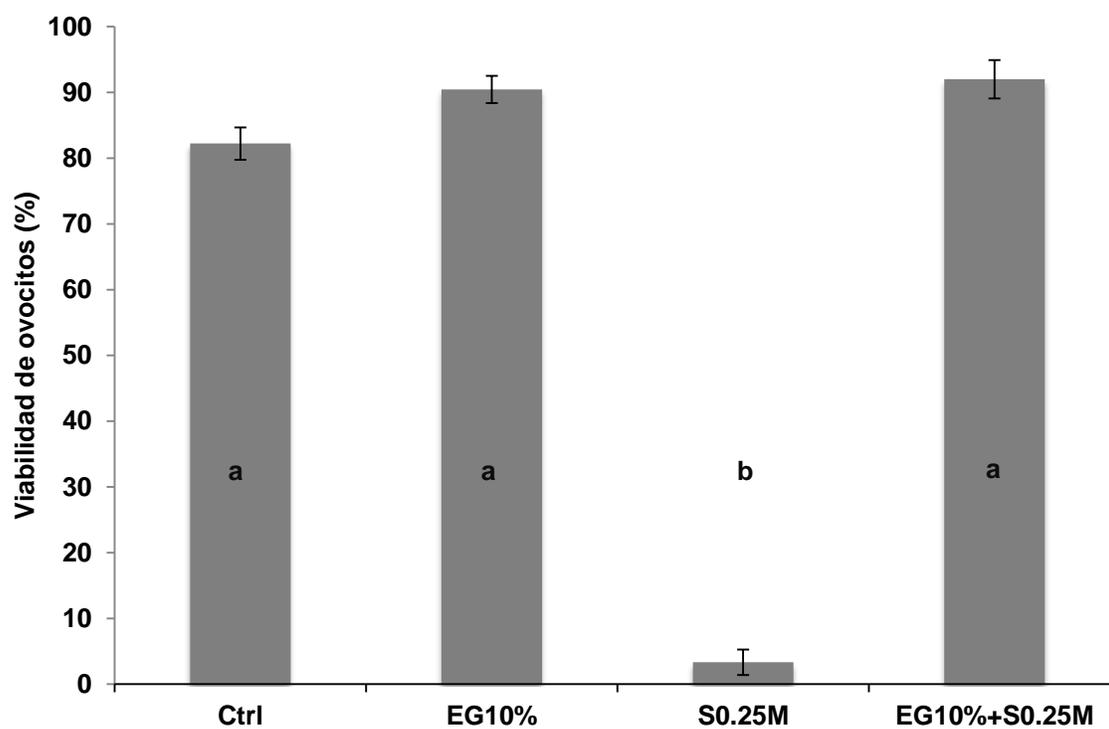


Figura 6. Porcentaje de viabilidad de ovocitos del ostión Pacífico después de la criopreservación. Ctrl: control; EG: etilen glicol; S: sacarosa. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha = 0.05$): a>b

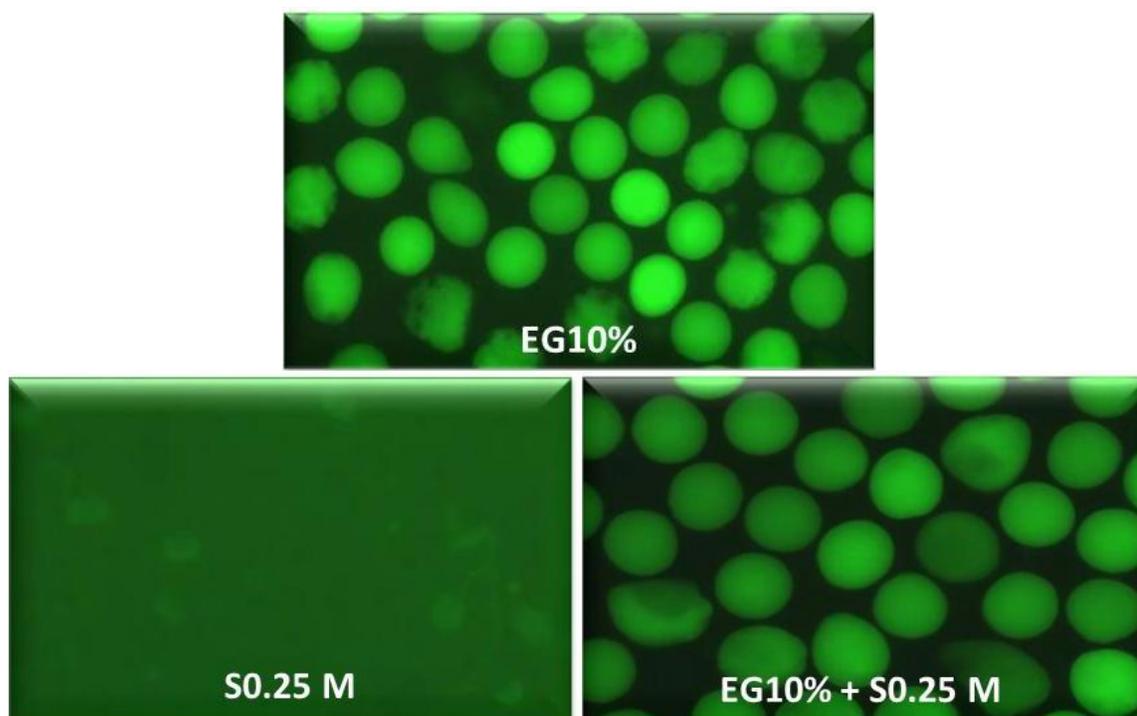


Figura 7. Viabilidad de ovocitos del ostión del Pacífico, *C. gigas*, descongelados y teñidos con FDA. EG: etilen glicol; S: sacarosa.

V.2.4. Evaluación de la organización del huso y la condensación de los cromosomas en ovocitos descongelados del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*

En lo que respecta a la organización del huso en ovocitos descongelados, en la mayoría de los ovocitos no se observaron husos, únicamente puntos brillantes. Los ovocitos congelados con EG10% sin huso organizado fueron el $73\% \pm 1$. En cuanto a los ovocitos congelados en la mezcla de EG10% y sacarosa 0.25 M no mostraron husos organizados. Estos tratamientos fueron significativamente diferentes ($P < 0.01$) comparados con los ovocitos control (Figura 8).

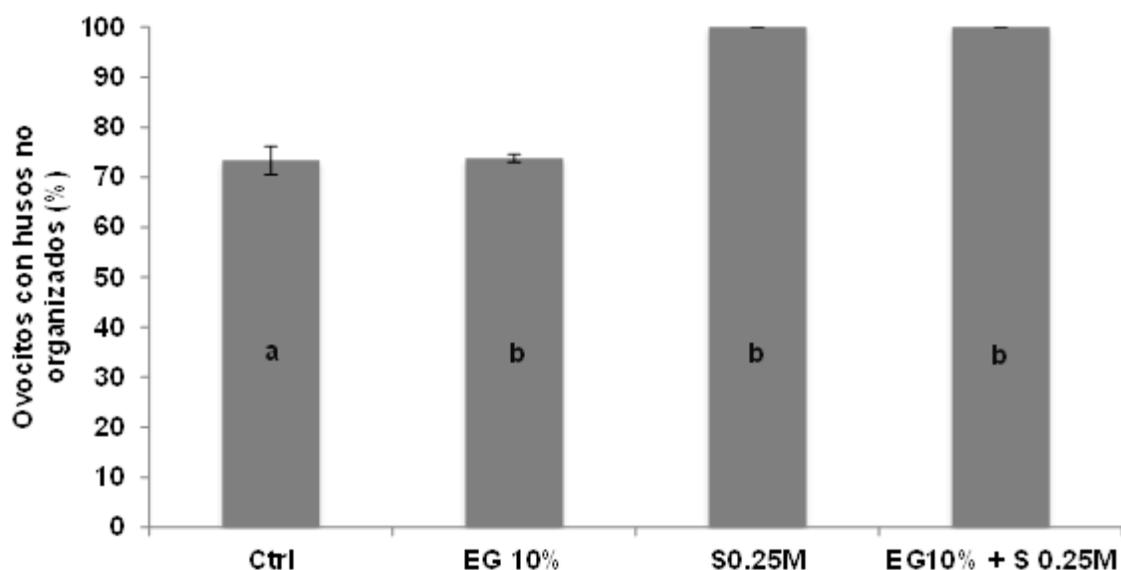


Figura 8. Ovocitos de *C. gigas* con husos no organizados; que corresponde a ovocitos descongelados. Ctrl: control; EG: etilen glicol; S: sacarosa. Letras diferentes significan que existen diferencias entre los tratamientos. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha = 0.05$): $a < b$

Se encontraron diferencias significativas en los tratamientos ($P < 0.001$). A diferencia de las muestras incubadas, los ovocitos descongelados no mostraron el mismo comportamiento en lo que se refiere a la organización del huso y la condensación de los cromosomas. En este caso, comparado con el control, todos los tratamientos tuvieron $< 26\%$ de ovocitos desconcondensados (Figura 9).

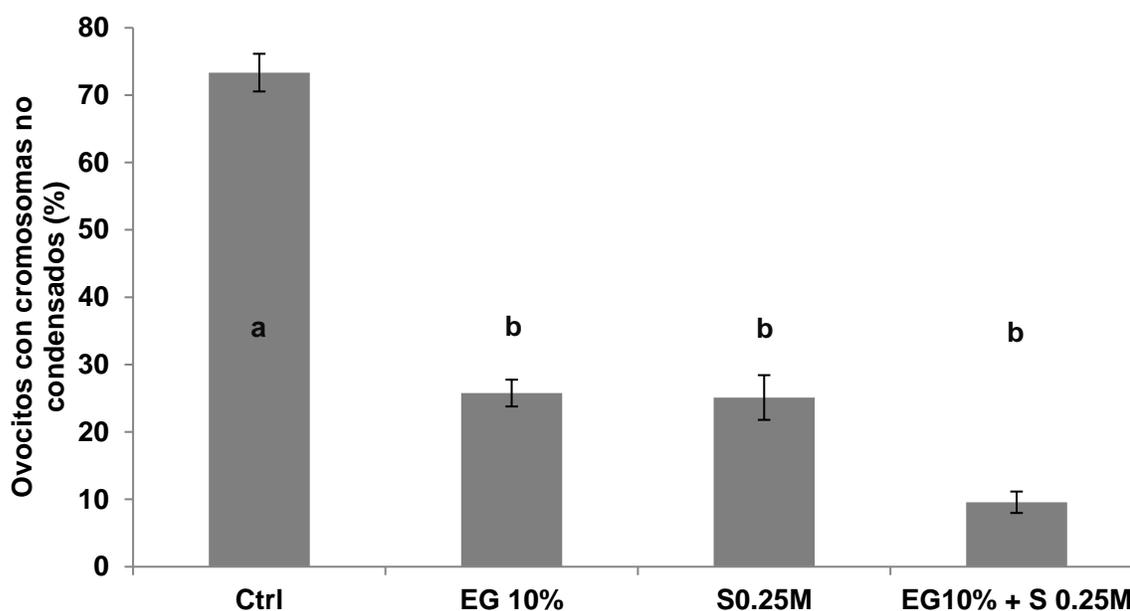


Figura 9. Condensación de los cromosomas de ovocitos descongelados del ostión del Pacífico *C gigas*. Ctrl: control; EG: etilen glicol; S: sacarosa. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha = 0.05$): a>b

V.2.5. Evaluación de la actividad de la proteína MAPK en ovocitos incubados en los crioprotectores

La criopreservación no afectó la actividad de la MAPK en los ovocitos congelados en EG10% y en la mezcla de EG10% y sacarosa 0.25 M. Sin embargo, la actividad de la MAPK disminuyó en los ovocitos congelados con S0.25 M (Figura 10).

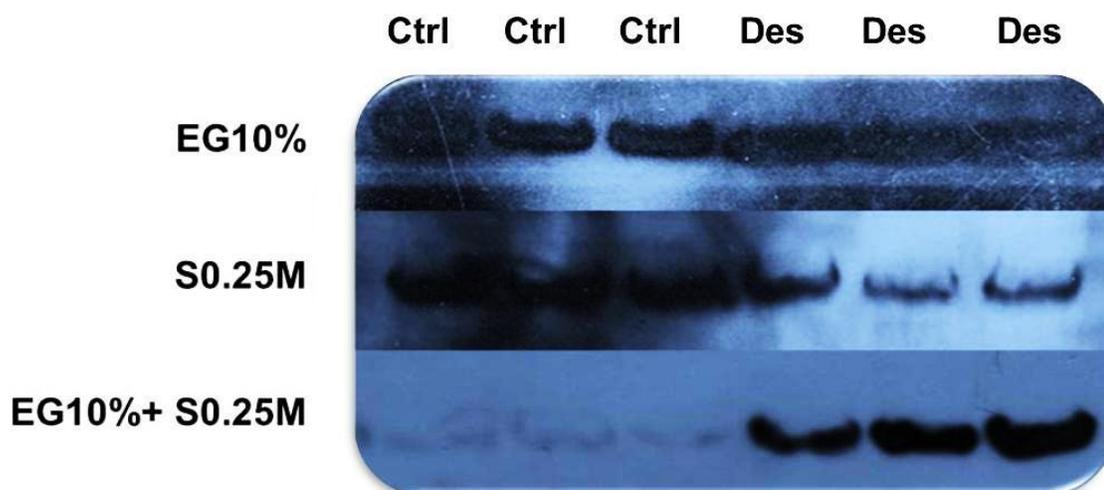


Figura 10. Actividad de la MAPK en los ovocitos del ostión del Pacífico criopreservados en los diferentes tratamientos. EG: etilen glicol; S: sacarosa; Ctrl: ovocitos control; Des: ovocitos descongelados.

V.2.6. Evaluación de la capacidad de los ovocitos descongelados para ser fertilizados

En todos los tratamientos se pudieron observar células fecundadas con dos o tres divisiones celulares después de 2 h de haber sido incubadas (Figura 11 A y B).

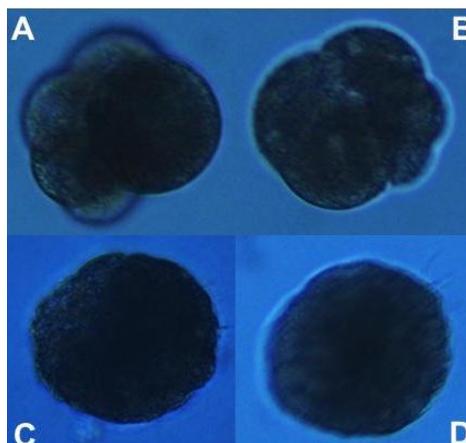


Figura 11. Fases de desarrollo después de la fertilización a partir de ovocitos descongelados. Panel A y B, células en división a dos horas de la fertilización. Panel C y D, larvas trocóforas a 12 h después de haber realizado la fertilización.

La fertilización de los ovocitos descongelados mostraron diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$). El control (ovocitos frescos) obtuvo el mayor número ($95 \pm 3\%$) de ovocitos fecundados a las 2 h de haberse llevado a cabo la fertilización. La mejor fertilización ($77 \pm 3\%$) de ovocitos descongelados se obtuvo con el tratamiento de EG10% seguida del tratamiento de la mezcla de EG10% y S0.25 M con un porcentaje de fertilización de $52 \pm 4\%$ (**Figura 12**).

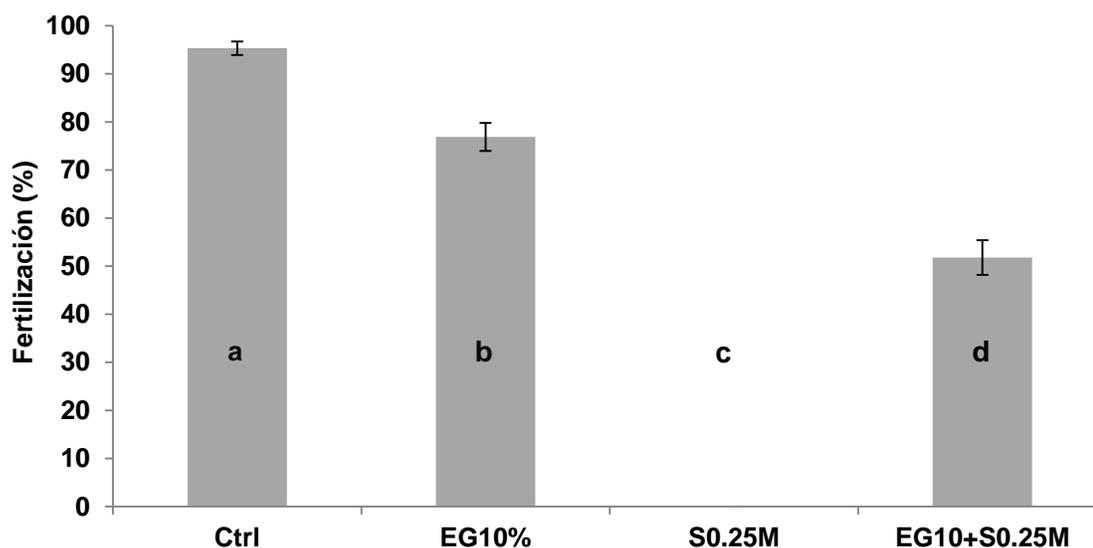


Figura 12. Comportamiento de la capacidad de fertilización de ovocitos a dos horas de haber realizado la fecundación. Ctrl: control; EG: etilen glicol; S: sacarosa; F: fertilizados; NF: no fertilizados. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha = 0.05$): $a > b > c > d$

Después de 12 h de haber realizado la fertilización, se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$). El tratamiento que no produjo larvas trocóforas fue S 0.25 M. La prueba *a posteriori* indica que este tratamiento fue diferente comparado con el control y los tratamientos de EG10% o la mezcla de EG10% y 0.25M S. Los porcentajes de larvas trocóforas desarrolladas después de 12 h, estuvieron entre $96 \pm 1\%$ y $82 \pm 4\%$ (Figura 13).

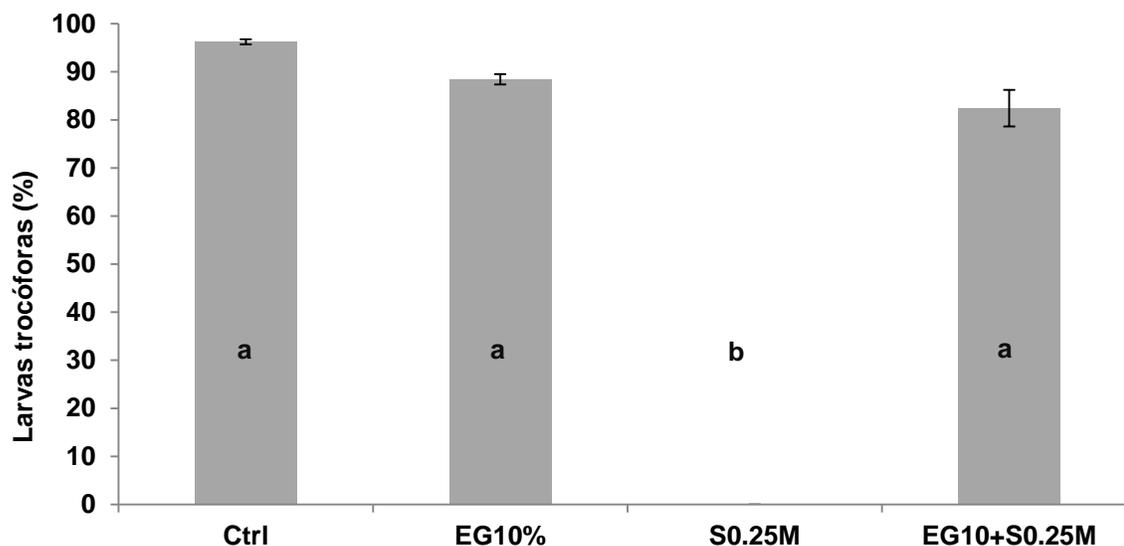


Figura 13. Producción de larvas trocóforas después de 12 h de haber realizado la fecundación. Ctrl: control; EG: etilen glicol; S: sacarosa; F: fertilizados; NF: no fertilizados. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha = 0.05$): $a > b$

V.3. Criopreservación de los ovocitos del abulón rojo *Haliotis rufescens*

V.3.1. Efecto de las soluciones crioprotectoras sobre los ovocitos del abulón rojo *Haliotis rufescens*

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.01$). En muestras control (Figura 14) el $99 \pm 1\%$ de los ovocitos se mantuvieron viables en el transcurso de los ensayos. Los mejores tratamientos fueron para los ovocitos incubados por 20 min en 0.2M de trehalosa ($96 \pm 1\%$ de viabilidad) y para los ovocitos incubados por 10 min en 0.4 M de trehalosa ($98 \pm 1\%$ de viabilidad), (Figura 14 y 15).

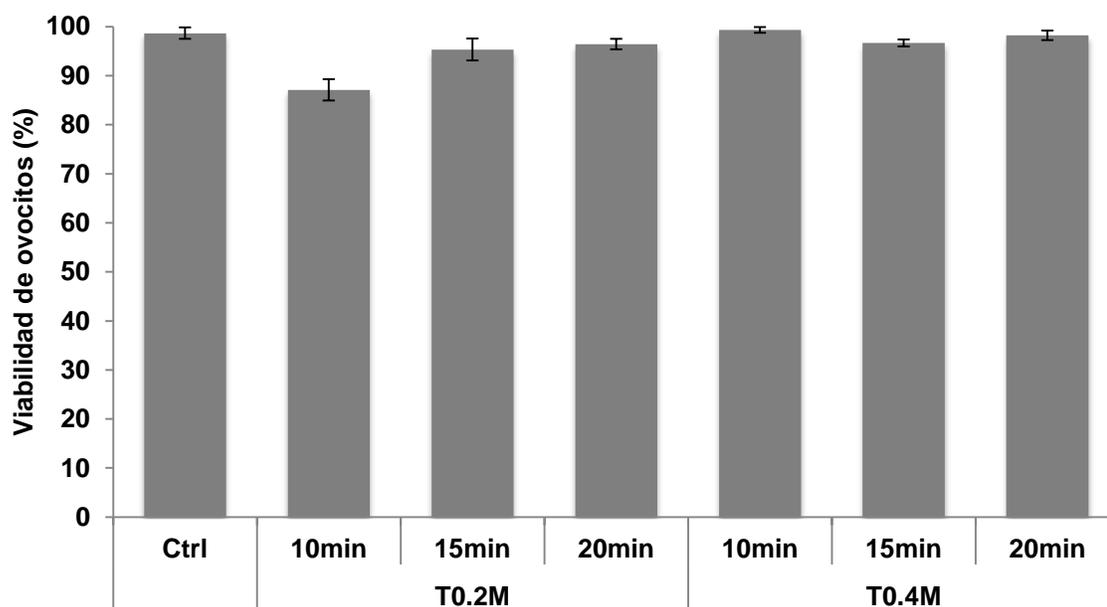


Figura 14. Porcentaje de viabilidad de ovocitos del abulón rojo, *Haliotis rufescens*, después de haber sido incubados en Trehalosa 0.2 y 0.4 M: T, trehalosa. Las letras en cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA y prueba *a posteriori* de Tukey $\alpha = 0.05$): a>b>c

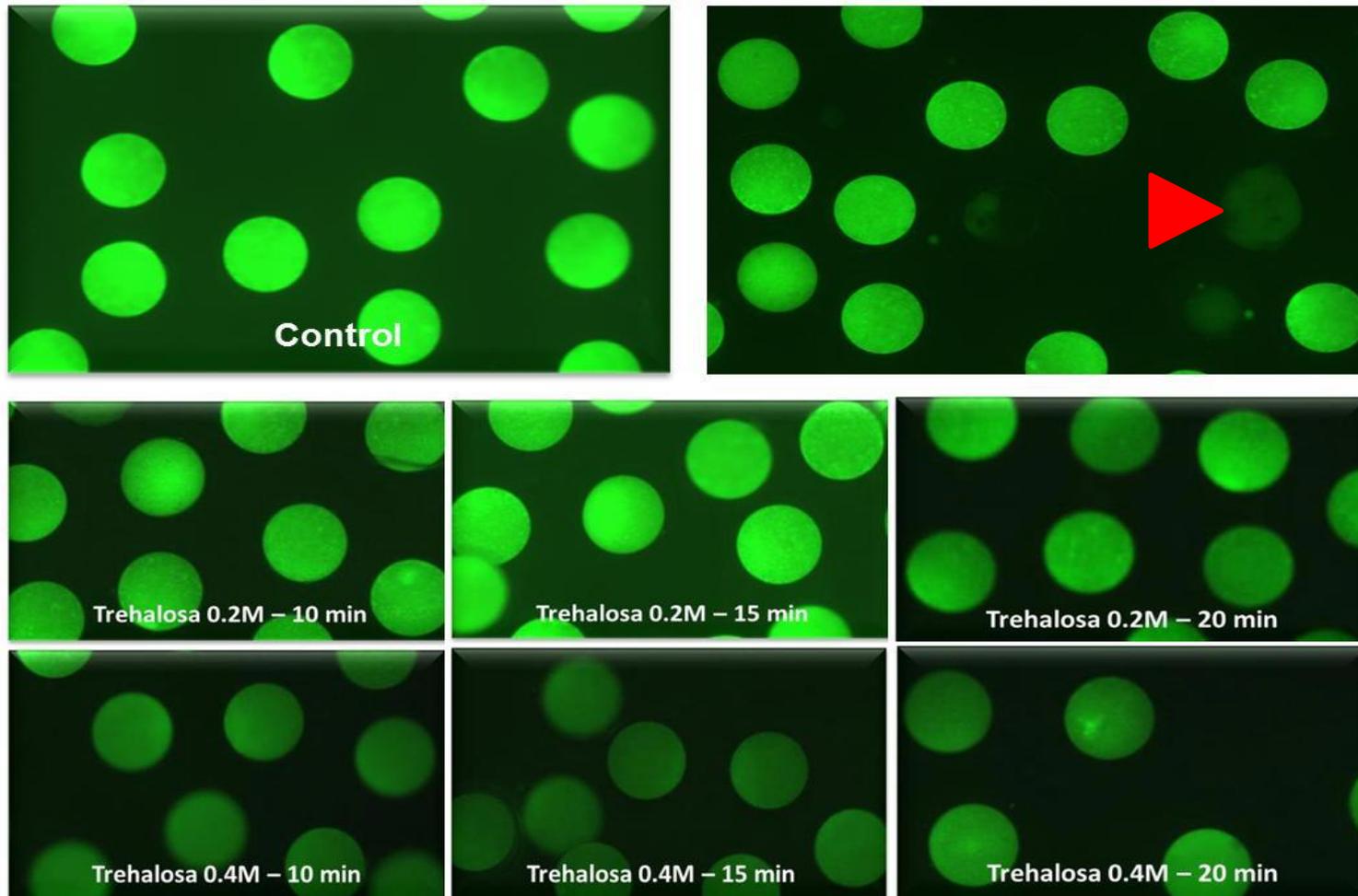


Figura 15. Ovocitos del abulón rojo *Haliotis rufescens* teñidos con FDA e incubados por diferentes tiempos en dos soluciones crioprotectoras. Las fotografías muestran las diferencias en intensidad de fluorescencia. Las flechas indican los ovocitos rotos producidos por la presión osmótica, que corresponden a ovocitos no viables.

V.3.2. Efecto de la criopreservación sobre la viabilidad de los ovocitos descongelados del abulón rojo *Haliotis rufescens*

No hubo viabilidad de los ovocitos después de la criopreservación usando trehalosa 0.4 M. Después de la descongelación se observaron únicamente ovocitos rotos, los cuales empezaban a perder vitelo hasta vaciarse. En general, todas las temperaturas de descongelación utilizadas mostraron el mismo comportamiento. Después de la descongelación y seguido de la dilución, primero se agregó una parte de AMF respecto del volumen de la muestra descongelada, ~ 0.5 mL, y se tenía planeado agregar una parte cada minuto; sin embargo, no fue posible ya que al momento de agregar AMF los ovocitos se rompían completamente (Figura 16). En la Figura 16, panel E1, se observa un ovocito que conservó su estructura por poco tiempo, y en panel E2 el mismo ovocito teñido con FDA emitiendo una baja intensidad de fluorescencia. El panel F1 muestra un ovocito completamente dañado y en F2 el mismo ovocito teñido con FDA y también, emitiendo una baja intensidad de fluorescencia. En ovocitos descongelados se observaron gotas de lípidos, fenómenos que no es observable en ovocitos frescos donde los lípidos se encuentran totalmente mezclados en el vitelo (Figura 16 paneles A, C y D).

V.3.3. Evaluación de la organización del huso, la condensación de los cromosomas y actividad de la proteína MAPK en ovocitos descongelados del abulón rojo *Haliotis rufescens*

Una vez que se realizó la tinción con DAPI de los ovocitos descongelados, las células que habían conservado su estructura finalmente se rompieron y solo pocos ovocitos pudieron teñirse. En la Figura 17 A y B, se pueden observar dos ovocitos intactos teñidos con DAPI y en los paneles C y D dos ovocitos dañados. En el panel B se observan dos puntos con fluorescencia que pudieran ser cromosomas condensados (indicados por la flecha) y en el panel D podrían corresponder a cromosomas dispersos.

Después de descongelar las muestras, se intentaron fijar las células para la tinción de la β tubulina. Sin embargo, al momento de agregar la solución de fijación, ocurrió el mismo evento que al momento de diluir las muestras. Las células que en un momento habían conservado su forma, terminaron por romperse. Así que tampoco se realizó la detección de la MAPK, considerando que no iba a ser posible realizar la fertilización de los ovocitos descongelados, ya que todos estaban dañados, ya fueran rotos o enteros pero, no viables.

No se realizaron ensayos de fertilización, porque no se pudieron recuperar células viables en ninguna de las tasas de descongelación que se practicaron.

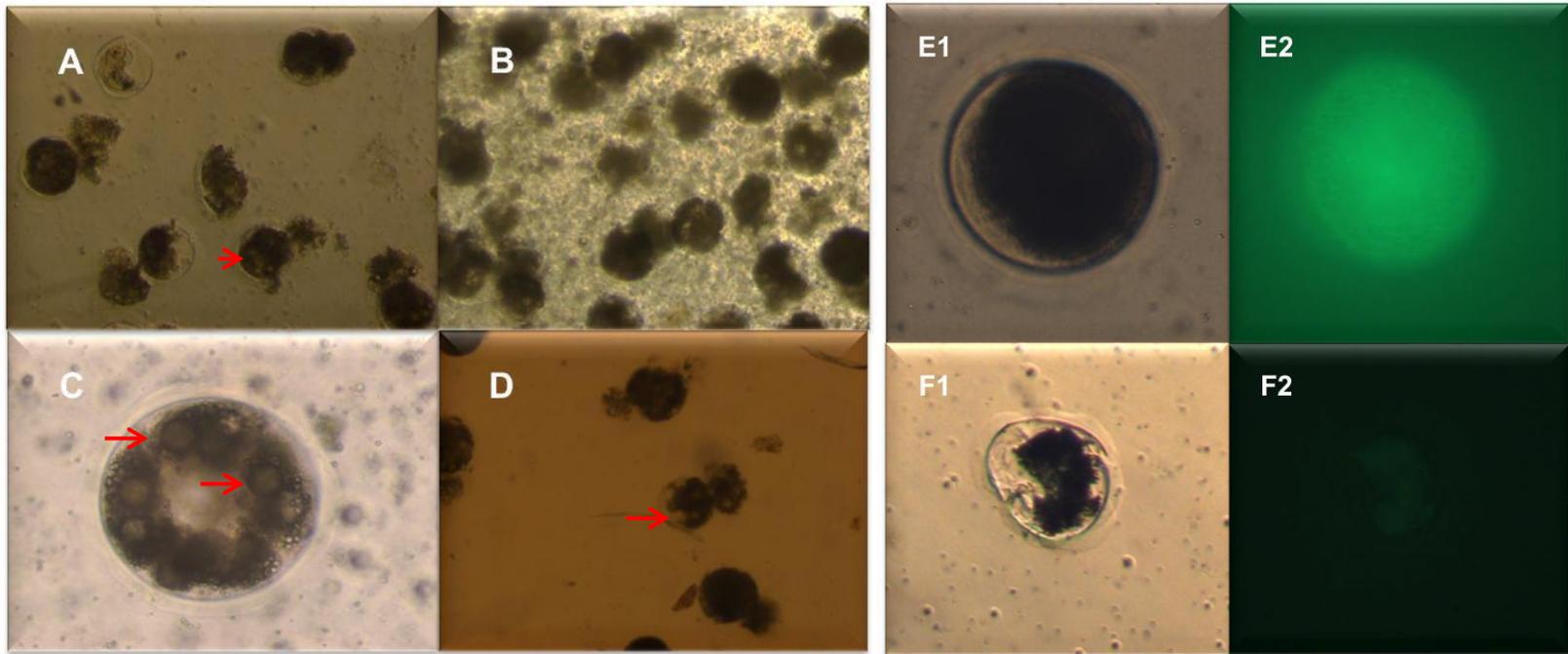


Figura 16. Ovocitos descongelados de abulón rojo *Haliotis rufescens*. Las fotografías muestran la condición en la que los ovocitos se observaron después de la descongelación. Paneles A y B, ovocitos descongelados mostrando rupturas y con vitelo fuera de la membrana citoplasmática. Paneles C y D, ovocitos mostrando gránulos de lípidos. Panel E1, ovocito entero. Panel E2, el mismo ovocito teñido con FDA. Panel F1, ovocito dañado. Panel F2, el mismo ovocito teñido con FDA, en todos los casos corresponden a ovocitos no viables. Las flechas indican gotas de lípidos.

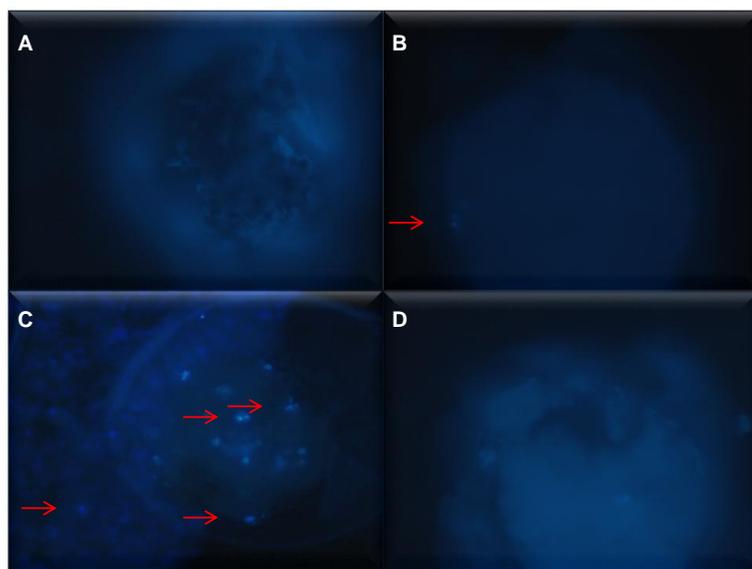


Figura 17. Ovocitos descongelados de abulón rojo *Haliotis rufescens* teñidos con DAPI. En todos los casos corresponden a ovocitos dañados. Paneles A y B, ovocitos intactos. Paneles C y D ovocitos dañados. Las flechas sugieren cromosomas condensados en el panel A y cromosomas dispersos en el panel C.

Capítulo VI. Discusión

VI.1 Criopreservación de los ovocitos del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*

En los últimos años la criopreservación de gametos y células de organismos acuáticos ha venido desarrollándose rápidamente. Se ha estimado que existen reportes de criopreservación de esperma de más de 200 especies de peces (Tiersch, 2000). Sin embargo, la criopreservación de ovocitos y embriones de especies acuáticas ha sido un cuello de botella debido a su complejidad fisiológica (Hagedorn y Kleinhans, 2000). Por más de 60 años, se ha trabajado intensamente para mejorar la criopreservación de ovocitos y embriones de especies acuáticas teniendo hasta el momento poco éxito. De esta manera, la evaluación del criodañó ha sido un objetivo importante para desafiar el reto de la criopreservación de ovocitos y embriones en especies acuáticas.

En general, el criodañó está relacionado a las características de las células y su sensibilidad a crioprotectores y tasas de congelación y descongelación, los cuales causan un daño morfológico y funcional considerable (Hagedorn y Kleinhans, 2000; Bogliolo, 2007). Por lo general, los daños morfológicos son los primeros en aparecer. Sin embargo, los daños funcionales muchas veces son evidentes hasta que se realizan las pruebas de fertilización. En este caso, la actividad de MAPK, la organización del huso acromático y condensación de los cromosomas, son algunos de los procesos que se pueden afectar por el proceso de criopreservación, el cual da como resultado una baja fertilización o desarrollo larval anormal.

Por otro lado, otra afectación se debe a los cambios que suceden por la presión osmótica sobre las células, alterando la estructura y la disminución del volumen de éstas, debido a la pérdida de agua, ya que se encuentran suspendidas en una solución hipertónica (Leibo, 2008). Aunque uno de los primeros pasos de la criopreservación es intentar deshidratar la célula, ésta no debe de sobrepasar el umbral del volumen crítico de la célula ya que es un punto de no retorno, en donde la célula no puede recuperar su volumen original ni su funcionalidad (Jain y Paulson, 2006, Leibo, 2008). Los daños a los que se ve expuesta la célula al sobrepasar el umbral del volumen crítico son: (1) cambio en el pH, el cual causa una desnaturalización de las proteínas, (2) “salamiento” producido por la precipitación de sales (eutéticos), el cual causa pérdida de la actividad enzimática de las proteínas, (3) citotoxicidad producida por hiperconcentración de algunos crioprotectores, entre otros daños (Pegg, 2007).

En este trabajo se encontró que efectivamente hubo un efecto tóxico debido a un daño relacionado al volumen crítico. Los ovocitos de ostión suspendidos en sacarosa >0.5 M se deshidrataron de tal manera que se sobrepasó el punto de no retorno dando como resultado ovocitos no viables.

Las células germinales o gaméticas, a diferencia de las somáticas, deben ser haploides cuando están listas para fertilización, este proceso se lleva a cabo mediante la meiosis. En la gónada, las células somáticas que dan origen a los ovocitos, se reproducen por mitosis, una vez formados los gametos, inician de nuevo el ciclo celular y quedan detenidas en el límite de la fase de G2 y la fase M, prácticamente al inicio de la profase de la meiosis. Una vez ahí, esperan el estímulo hormonal y/o la fertilización para proseguir la meiosis y quedar haploides. Existen ovocitos que después del estímulo hormonal se detienen en metafase I o II de la meiosis en espera de la fertilización, mientras que otros llegan totalmente hasta la haploidia, esto es variable entre las especies. En el caso del ostión, sus ovocitos maduros, esto es listos para fertilizarse, están en metafase I de la meiosis

sin embargo, cuando los ovocitos se extraen directamente de la gónada se encuentran inmaduros en la etapa de profase, con los cromosomas descondensados (Colas y Dubé, 1998; Leclerc, 2000). En esta etapa de profase, se ha demostrado (Tervit *et al.*, 2005; Rascon-Heimpel, 2008) que los ovocitos son mejores para criopreservarse ya que conservan el núcleo intacto o vesícula germinal y esto evita que sean frágiles como sucede cuando están maduros en metafase I, donde se observan sin núcleo y los cromosomas condensados. En este trabajo, los ovocitos de ostión se obtuvieron directamente de la gónada por lo que un gran porcentaje (>70%) de las células se encontraron en profase. Sólo en el caso del tratamiento con EG10% tuvo un mayor porcentaje de ovocitos maduros (36%). Con respecto a la posibilidad de encontrar un daño a nivel celular, debido a la suspensión de los ovocitos en los diferentes crioprotectores, se observó que tanto la organización del huso y la condensación de los cromosomas no se afectaron.

Además uno de los principales objetivos de este trabajo, fue tratar de incrementar la sobrevivencia de los ovocitos descongelados de ostión utilizando un método modificado al utilizado por el grupo de criobiología de Nueva Zelanda. Por lo que se utilizó un congelador programable, en el cual se pueden colocar mucho más muestras que en el congelador utilizado por el grupo de Tervit *et al.* (2005), además de agregar otro aditivo al crioprotector (sacarosa). Los resultados de este trabajo indican que la adición de sacarosa no incrementó la viabilidad de los ovocitos y que la mezcla obtuvo resultados similares a los obtenidos con EG10%. Interesantemente, la adición de la sacarosa a concentraciones > 0.25M mostró una pérdida de la viabilidad de los ovocitos. Este resultado se puede deber a que el tiempo de equilibrio usado no fue el suficiente para que el azúcar pudiera estabilizar la estructura de los ovocitos. La manera en la que los azúcares actúan como crioprotectores es produciendo una deshidratación y ayudan a eliminar un porcentaje de agua de la célula, mediante la interacción con los fosfolípidos (Leslie *et al.*, 1995). En este último caso, el azúcar se intercala entre los fosfolípidos,

para evitar una interacción entre ellos. Es decir, evita una atracción por fuerzas de Van der Waals entre los fosfolípidos debida a la ausencia de agua en el proceso de congelación (Leslie *et al.*, 1995). Por otra parte, en la criopreservación de los ovocitos humanos la concentración que mayormente ha demostrado efecto crioprotector es la sacarosa a una concentración de 0.3 M con un tiempo de equilibrio de 10 min, pero mezclado con un crioprotector penetrante en este caso, propanediol 1.5 M (Fabbri *et al.*, 2001). Sin embargo, una vez más se confirmó que los procedimientos de criopreservación son especie específico y tejido específico, ya que en nuestro caso la sacarosa a 0.25 M no ofreció ningún beneficio en la criopreservación de los ovocitos de ostión y las concentraciones por encima de este valor disminuyeron la viabilidad de los ovocitos antes de congelarlos.

Por otra parte, se ha observado que la criopreservación de ovocitos humanos con mezcla de crioprotectores penetrantes y no penetrantes a la célula, ejerce mayor protección (Fabbri *et al.*, 2001, Jain y Paulson, 2006) y que esta protección estuvo relacionada con la concentración del azúcar (mientras mayor concentración mayor protección, en un intervalo de 0.1 a 0.3 M). No obstante, en el presente estudio, la mezcla de ambos crioprotectores: etilen glicol (crioprotector penetrante) y sacarosa (crioprotector no penetrante), no ejercieron una mayor protección. Lo que indica que la mezcla de dos tipos de crioprotectores no necesariamente ejercerá mayor protección, aunque, es necesaria estudio considerando que la respuesta es especie específico. Además de ello, la efectividad de los crioprotectores se ve asociada al tamaño celular, ya que en células con mayor tamaño, la penetración y la eliminación de los crioprotectores ocurren más lentamente, aun cuando la eliminación no sucede en su totalidad, siendo un proceso completamente aleatorio (Pegg, 2007).

En general, se sabe que las temperaturas bajas (4°C) causan la despolimerización de los microtúbulos, ya que no se permite la asociación de los dímeros de α y β

tubulina y por lo tanto, no hay un huso (Lodish *et al.*, 2008). En los ovocitos humanos los husos en metafase II se despolimerizan irreversiblemente cuando las células se exponen por tiempo breve a 0°C (Zenzes *et al.*, 2001). En este estudio se observó que después de la descongelación, el único tratamiento que presentó el huso organizado en un 27% fue el tratamiento con EG10%, muy similar a antes de ser criopreservado, indicativo que se conservó durante el proceso de criopreservación. Sin embargo, se observó que la condensación de los cromosomas en los tratamientos de sacarosa 0.25M y la mezcla de EG10% y S0.25M a pesar de que en estas muestras el 100% de los ovocitos no tuvieron organización del huso, indicativo de algún daño a la proteína de los microtúbulos. Esto se puede deber a que en ambos casos, la organización del huso y la condensación de los cromosomas después de la descongelación, fueron clasificados como huso organizado y no organizado y cromosomas condensados y no condensados, ya que no fue posible distinguir entre categorías de organización del huso y clases de condensación de los cromosomas. Por ejemplo, Goticchio *et al.* (2006) distinguen tres categorías de la organización del huso y la condensación de los cromosomas. Huso organizado y cromosomas alineados en el ecuador; huso desordenado e irregular distribución de los cromosomas; ausencia de huso y cromosomas desorganizados. Estos autores usaron microscopia confocal, misma que les permitió hacer esta distinción a partir de las imágenes en tercera dimensión, herramienta con la que no se contó en este trabajo y no se pudo constatar el grado de condensación de los cromosomas relacionados con la organización del huso.

Como se dijo anteriormente, en los daños producidos por la criopreservación, se incluyen los cambios en la polarización de lípidos, desestabilización de la bicapa lipídica de la membrana celular y desnaturalización de las proteínas (Chao y Liao, 2001; Özkavukcu y Erdemli, 2002). Las proteínas son fundamentales en la función y estructura de la célula. Por ejemplo, en el caso de las proteínas relacionadas con la movilidad de los espermatozoides, éstas se desactivaron y

desnaturalizaron dando como consecuencia una tasa baja de fertilización (Zilli *et al.*, 2005; Zilli *et al.*, 2008). En ovocitos, una de las proteínas de mayor importancia son las MAPK, las cuales se encuentran involucradas en los procesos de la división y diferenciación celular. En la almeja se ha encontrado que esta proteína muestra actividad durante la maduración de los ovocitos y al momento que la vesícula germinal se rompe (Whitaker, 1996). También se encuentra involucrada en el arresto de la metafase I de ostiones y mejillones (Portillo-López *et al.*, 2003), con mínima o nula actividad durante la profase (Stephano y Gould, 2000; Hengyu *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos sobre la actividad de la proteína MAPK concuerdan con lo descrito anteriormente, ya que se detectó mínima actividad de la proteína en los ovocitos control (recién extraídos de la gónada o después de haberse tratados con los crioprotectores antes de ser congelados). Además, este comportamiento se ve asociado con que la mayoría de las células que se encontraban en profase.

De acuerdo a los resultados de Rascón-Heimpel (2008), en este trabajo también se encontró que la proteína MAPK sigue activa en los ovocitos descongelados. Existe poca información relacionada al efecto de la criopreservación sobre la integridad de proteínas después de la descongelación. Zilli *et al.* (2005) investigaron el efecto que tiene el proceso de criopreservación sobre las proteínas en espermatozoides del robalo *Dicentrarchus labrax*, ellos observaron que la congelación-descongelación provocó la degradación de proteínas que se encuentran involucradas en la motilidad. También reportaron la disminución de la actividad de proteínas y en otros casos la ausencia de expresión después de la criopreservación.

En una publicación, Zilli *et al.* (2008) determinaron el patrón de la fosforilación de proteínas que están relacionadas con la motilidad del espermatozoide del robalo. En esta ocasión, ellos obtuvieron que el estado de fosforilación de las proteínas cambio

después de la descongelación. Particularmente, hallaron que la criopreservación activó a las cinasas, principalmente las que tienen residuos treonina. Tomando en cuenta que las MAPK son cinasas que requieren de una activación dual en los residuos serina/treonina. De acuerdo a lo encontrado en este estudio, el comportamiento de la MAPK en este trabajo no se afectó, aunque hay que considerar que la señal captada de MAPK fosforilada por la técnica de Western blot implica que es proporcional al número de ovocitos en proceso de maduración y por ende mayor actividad de MAPK, ya que MAPK se desactivará al momento de la fertilización (Gould y Stephano, 2000). Hay que considerar que los ovocitos con baja actividad de MAPK en profase, tenderán a madurar con la exposición al agua de mar (Gould y Stephano, 2000) y aumentará la actividad de MAPK, por lo que los ovocitos descongelados y tratados posteriormente con lavados para retirar el criopreservador tendieron a madurar y a activar MAPK, lo cual es una señal de viabilidad celular.

La fertilización de los ovocitos después de la criopreservación viene a ser la prueba más importante de la funcionalidad de un protocolo de criopreservación, aunque consume tiempo y recursos. Los resultados obtenidos indican que la fertilización de ovocitos criopreservados en EG10% fue del 77% después de 2 h de haber sido fertilizados. Estos resultados concuerdan con los de Tervit *et al.* (2005), indicando que la modificación realizada con respecto al equipo utilizado no afecta el proceso de criopreservación. Por otra parte, el porcentaje de larva trocófora (88%) fue superior al porcentaje de ovocitos fertilizados en el mismo tratamiento indicando que hubo un retraso en el desarrollo debido, probablemente al tiempo utilizado para eliminar el crioprotector antes de fertilizarse. Hasta esta fase, los resultados indican una reproducibilidad buena de los experimentos y la factibilidad de poder realizar criopreservación masiva de ovocitos. Este hallazgo es de gran importancia para la industria acuícola ya que abre la posibilidad de la comercialización de ovocitos congelados de ostión, así como también la gran posibilidad de apoyar programas de conservación, la utilización de ovocitos para

ensayos toxicológicos, además de su utilización como modelos en investigaciones de biotecnología reproductiva, entre otros beneficios.

Aunque el objetivo principal del presente trabajo era incrementar la fertilización de los ovocitos y la sobrevivencia de larvas con un método alternativo, se encontró que la mezcla de EG10% y S0.25M produjo, al igual que el experimento realizado con EG10%, un porcentaje de larvas (82%) el cual no fue significativamente diferente al porcentaje encontrado en ovocitos congelados con EG10%. Esto indica que ambos procedimientos se pueden utilizar alternativamente. Al igual que en los ovocitos descongelados con EG10%, el desarrollo larval se retrasó por las mismas razones antes mencionadas. En la congelación de los ovocitos del mejillón *Perna canaliculus*, Adams *et al.*, (2009) usaron trehalosa mezclado con etilen glicol con la cual obtuvieron la mayor tasa de fertilización. Lo que es indicativo de que la mezcla de dos tipos de crioprotectores, penetrante y no penetrante, en determinados casos puede ofrecer mayor protección.

Aunque los experimentos terminaron en el desarrollo de larva trocófora, es necesario seguir monitoreando a etapas de desarrollo más avanzada ya que se ha observado que aunque se tienen buenos resultados hasta ciertas etapas de su vida, algunas disfunciones genéticas se pueden detectar en etapas de desarrollo tardías, sobre todo por el daño que se genera el ADN (Gwo *et al.*, 2003).

VI.2 Criopreservación de los ovocitos del abulón rojo *Haliotis rufescens*

Por otro lado, en este trabajo se hizo el primer intento por criopreservar ovocitos del abulón rojo y hasta el momento ha sido difícil. Solo dos publicaciones existen y están relacionadas con la permeabilidad de los ovocitos hacia los crioprotectores (Lin *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1995). Por lo tanto, se tiene la necesidad de realizar más investigación en todos los tópicos relacionados a la criopreservación de los ovocitos de esta especie. En este caso, nuestro trabajo se ha enfocado en tratar de evaluar el daño a nivel celular y estructural de estos organismos.

Uno de los problemas de los ovocitos de abulón son sus características propias como son: el tamaño, el tipo de membrana, el contenido de lípidos, el tipo de detención celular, el número limitado de ovocitos por muestra; los anteriores son aspectos importantes a considerar también para la criopreservación de ovocitos de cualquier especie (Leibo, 2008). A diferencia de los ovocitos de ostión, los ovocitos de abulón rojo no se pueden extraer directamente de la gónada, ya que para fertilizarlos, éstos deben haber completado la maduración meiótica dentro de la gónada. De esta manera, las hembras se tuvieron que inducir al desove para obtener los ovocitos. Una característica importante de los ovocitos de abulón es su tamaño, 250 μm , además su membrana citoplasmática cuenta con un corion, el cual es impermeable. Empezando por este último factor, la selección del crioprotector más adecuado es un reto. Debido a esta impermeabilidad, se decidió utilizar trehalosa en dos concentraciones 0.2 y 0.4 M. De acuerdo a nuestros resultados, se encontró que los ovocitos suspendidos en estas dos concentraciones de trehalosa no tuvieron diferencias en la exposición de los ovocitos sin congelar, con respecto a los ovocitos frescos utilizados como control.

Aunque no hubo diferencia entre las dos concentraciones de crioprotector utilizadas para suspender a los ovocitos, se decidió utilizar solo trehalosa 0.4 M para su criopreservación. Los resultados de la criopreservación indicaron que no hubo viabilidad de los ovocitos después de haber sido descongelados. Existen varios factores que posiblemente contribuyeron a que se tuvieran resultados negativos en estos experimentos. El primero de ellos es que es posible que las concentración del crioprotector y tiempo de equilibrio usados no hayan sido los adecuados.

Otro factor es la tasa de congelación. Mucho se ha discutido sobre el beneficio de utilizar una tasa de congelación lenta, rápida o controlada ya que en muchas ocasiones se ha observado que no todos los ovocitos toleran alguno de estos métodos de congelación (Hamaratđlu *et al.*, 2005). Por lo que es necesario seguir

experimentando con otras tasas de congelación. Respecto a las tasas de congelación, en nuestro trabajo se utilizó el protocolo de criopreservación desarrollado por Borini *et al.* (2006), donde la tasa de descongelación consistió en extraer las muestras del nitrógeno líquido y mantenerlas durante 30 s a temperatura ambiente y posteriormente en un baño de agua a 40°C. En este caso este procedimiento y las otras cinco tasas de descongelación no produjeron ovocitos viables. Ya que en ninguno de los casos la tasa de descongelación fue tan rápida como para que el hielo formado se descongelara rápidamente. Tomando en cuenta que las tasas de descongelación deben ser lo suficientemente rápidas como para evitar la formación de hielo (Pegg, 2007).

Otra opción es la congelación de ovocitos en profase. Por ello es recomendable diseñar una metodología para poder obtener ovocitos profásicos directamente de la gónada y criopreservarlos, para después de descongelados, poderse madurar y fertilizar para comprobar que sean funcionales.

Por otro lado se intentó evaluar la organización del huso y la condensación de los cromosomas en ovocitos que al momento de ser descongelados parecían intactos. Sin embargo, al momento de agregar la solución fijadora muchos de ellos se rompieron. De los pocos ovocitos que soportaron el procedimiento se logró visualizar lo que parecieran cromosomas condensados. Sin embargo, existen muchas dudas sobre ello y esto pueden ser datos no confiables.

Capítulo VII. Conclusiones

1. Es posible obtener larvas trocóforas de ostión del Pacífico utilizando un equipo diferente al utilizado por Tervit *et al.* (2005).
2. Es posible utilizar el EG10% o la mezcla de EG10% y sacarosa 0.25M indiferentemente para congelar ovocitos del ostión del Pacífico.
3. El uso de sacarosa como aditivo al crioprotector EG no ofreció un incremento en la producción de larvas trocóforas del ostión del Pacífico.
4. La organización del huso en los ovocitos descongelados sólo fue observable en los ovocitos en metafase I, no se discriminaron anomalías.
5. No se pudieron distinguir estados de condensación de los cromosomas.
6. La viabilidad de los ovocitos de abulón rojo no fue afectada por la incubación de éstos en 0.2 M o 0.4 M de trehalosa.
7. La trehalosa por sí sola no ofreció protección a los ovocitos del abulón rojo.
8. No fue posible obtener ovocitos de abulón rojo viables después de la descongelación.

Capítulo VIII. Recomendaciones

1. Es necesario continuar con experimentos de desarrollo larval del ostión del Pacífico para ver si las larvas tienen un desarrollo normal, a partir de las células congeladas con la mezcla etilen glicol y sacarosa.
2. Realizar experimentos para evaluar si la mezcla de EG y sacarosa pueden producir mayor cantidad de larvas para el asentamiento que las obtenidas por Tervit *et al.* (2005).
3. Es necesario seguir con nuevos experimentos para la criopreservación de ovocitos de abulón, considerando el uso de dos tipos de crioprotectores, penetrante y no penetrante; y corroborar si estos pueden ofrecer protección durante la criopreservación.
4. También resulta necesario diseñar una metodología para obtener ovocitos del abulón rojo en profase (directamente de la gónada) y criopreservarlos. Asimismo, congelar ovocitos en profase y en metafase.

IX. Literatura citada

Adams S. L., Hessian P. A. y Mladenov P. V. 2003. Flow cytometric evaluation of mitochondrial function and membrane integrity of marine invertebrate sperm. *Invertebrate, Reproduction and Development*. 44 (1): 45-51.

Adams S. L., Smith J. F., Roberts R. D., Janke A. R., King N. G., Tervit H. R. y Webb S. C. 2008. Application of sperm cryopreservation in selective breeding of the Pacific oyster, *Crassostreagigas*(Thunberg). *Aquaculture Research*. 39: 1434 - 1442.

Adams, S. L., Tervit H. R., McGowan L. T., Smith J. F., Roberts R. D., Salinas-Flores L., Gale S. L., Webb S. C., Mullen S. F. y Critser J. K. 2009. Towards cryopreservation of Greenshell™ mussel (*Perna canaliculus*) oocytes. *Cryobiology*. 58 (1): 69 – 74.

Allen S. K. y Bushek D. 1992. Large-scale production of triploid oysters, *Crassostreavirginica*(Gmelin), using “stripped” gametes. *Aquaculture*. 103:241-251.

Aman R. R. y Parks J. R. 1994. Effects of Cooling and Rewarming on the Meiotic Spindle and Chromosomes of In Vitro-Matured Bovine Oocytes. *Biology of Reproduction*. 50: 103 – 110.

Bianchi V., Coticchio G., Fava L., Flamigni C. y Borini A. 2005. Meiotic spindle imaging in human oocytes frozen with a slow freezing procedure involving high sucrose concentration. *Human Reproduction*. 20 (4): 1078 – 1083.

Boender J. 1984. Fluorescein diacetate, a fluorescent dye compound stain for rapid evaluation of the viability of mammalian oocytes prior to *in vitro* studies. *The Veterinary Quarterly*. 6 (4): 236 – 240.

Bogliolo L., Ariu F., Fois, S., Rosati I., Zedda M. T., Leoni G., Succu S., Paua S., y Ledda S. 2007. Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. *Theriogenology*. 68: 1138-1149.

Borini A., Sciajno R., Bianchi V., Serini E., Flamigni C. y Coticchio G. 2006. Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. *Human Reproduction*. 21 (2): 512 – 5127.

Bromage N. R. y Roberts R. J. 2001. Broodstock management and egg and larval quality. Black Well Science Ltd., Malden, 424 p.

Cabrita E., Robles V., Chereguini O., Wallacw J. C. y Herráez M. P. 2003. Effect of different cryoprotectants and vitrification solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology*. 47: 204 – 213.

Chao N. H., Lin T. T., Chen Y. J., Hsu H. W. y Liao I. C. 1997. Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam. *Aquaculture*. 155 (1-4): 31-44.

Chao N. H. y Liao I. C. 2001. Cryopreservation of Finfish and Shellfish Gametes and Embryos. *Aquaculture*. 197: 161 - 189.

Chen S. U., Lien Y. R., Chao K. H., Ho H. N., Yang Y. S. y Lee T. Y. 2003. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing -/a review article. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 202: 101 – 107.

Chen C. P., Hsu H. W., Lei S. F., Chang C. H. 1989. Peliminary study on the cryopreservation of Pacific oyster oocytes. *J. Fish Soc. Taiwan*. 16: 197 – 2001.

Colas P. y Dubé F. 1998. Meiotic maturation in mollusk oocytes. *Cell and Developmental Biology*. 9: 539-548.

Compton D. A. 2000. Spindle assembly in animal cells. *Annual Review of Biochemistry*. 69: 95 – 114.

Coticchio G., De Santis L., Rossi G., Borini A., Albertini D., Scaravelli G., Alecci C. Bianchi V., Nottola S. y Cecconi S. 2006. Sucrose concentration influences the rate of human oocytes with normal spindle and chromosome configurations after slow-cooling cryopreservation. *Human Reproduction*. 21 (7):1771–1776.

Curry M. R. 2007. Cryopreservation of mammalian semen, en *Methods in Molecular Biology* 368: 303–311.

Di Matteo O., Langelloti A. L., Masullo P. y Sansone G. 2009. Cryopreservation of Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) spermatozoa. *Cryobiology*. 58: 145 – 150.

Dupré E & Espinoza C. 2004. Congelamiento de espermatozoides del ostión del norte *Argopecten purpuratus* mediante congelador mecánico. *Investigaciones Marinas*, 32, 2. 3 - 9.

Fabri R, Porcu E., Marsella T., Rocchetta G., Venturoli S. y Flamigni C. 2001. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Human Reproduction*. 16 (30): 411 – 416.

Coticchio G., De Santis L., Rossi G., Borini A., Albertini D., Scaravelli G., Alecci C., Bianchi V., Nottola S. y Cecconi S. 2006. Sucrose concentration influences the rate

of human oocytes with normal spindle and chromosome configurations after slow-cooling cryopreservation. *Human Reproduction*. 21 (7): 1771 - 1776.

Gravance C. G., Vishwanath R., Pitt C., Garner D. L. y Casey P. J. 1998. Effects of Cryopreservation on Bull Sperm Head Morphometry. *Journal of Andrology*. 19 (6): 704 – 709.

Gwo J.C. 2000. Cryopreservation of Aquatic Invertebrates Semen: A Review. *Aquaculture Research*. 31: 259-271.

Gwo J. C., Wu C. Y., Chang W. S. P. y Cheng H. Y. 2003. Evaluation of damage in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa before and after cryopreservation using comet assay. *Cryoletters*. 24 (3): 171-180.

Hagedorn M. y Kleinhans F. W. 2000. Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos. En *Cryopreservation in Aquatic Species*. Tiersch, T. R. y P. M. Mazik, Editores. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. Pp. 161-178.

Hamaratoğlu F., Eroğlu A. Toner M. y Sadler K. C. 2005. Cryopreservation of starfish oocytes. *Cryobiology*. 50: 38 – 47.

Hanquet-Dufour A. C., Kellner K., Heude C., Naimi A., Mathieu M. y Poncet J. M. 2006. Cryopreservation of *Crassostrea gigas* vesicular cells: viability and metabolic activity. *Cryobiology*. 53: 28 – 36.

HausserScientific®. Instrucciones de uso del hemetocitómetro de campo claro, en: <http://www.hausserscientific.com/> en la sección instrucción de uso del producto. Última actualización 02 de febrero de 2006.

Hengyu F., Chao T., Dayuan C. y Qingyuan S. 2002. Roles of MAP kinase signaling pathway in oocyte meiosis. *Chinese Science Bulletin*. 47 (14): 1157 – 1162.

Holt W. V. 2001. Genetic resources banking and maintaining biodiversity, en *Cryobanking The Genetic Resources, Wildlife Conservation for the Future?*. Watson P F y Holt W V, Eds. TAYLOR and FRANCIS, Nueva York. Páginas 9 – 20.

Ishikawa H., y Kaneko S. 2007. Human sperm cryopreservation – Theory and clinical application. *Journal of Mammalian Ova Research*. 24 (1): 14 – 17.

Jain J. K. y Paulson R. J. 2006. Oocyte cryopreservation. *Fertility and Sterility*. 86, 3. 1037 – 1046.

James J. S., Cohen J. 2004. An overview of oocyte cryopreservation. *Reproductive Biomedicine*. 9 (2): 152 – 163.

- Kopf G. S., Lewis C. A. y Vacquer V. D. 1983. Regulation of abalone sperm cyclic AMP concentration and the acrosome reaction by calcium and methylxantines. *Developmental Biology*. 98: 28-36.
- Leclerc C., Guerrier P. y Moreau M. 2000. Role of dihydropyridine-sensitive calcium channels in meiosis and fertilization in the bivalve molluscs *Ruditapes philippinarum* and *Crassostrea gigas*. *Biology of the Cell*. 92: 285–299.
- Leibo S P. 2008. Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology*. 69. 37–47
- Leighton D. L. 2000. Reproduction, en *The biology and culture of the California abalones*. Dorrence Publishing Co., Inc. Pittsburg. Págs.: 64 – 75.
- Leslie S. B., Israeli E., Lighthart B., Crowe J. H. y Crowe L. M. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (10): 3592–3597.
- Lin T. T., Chen F. L., Chao N. H., 1992. Osmometric characteristics of small abalone eggs. *Cryobiology* 29. Ž6., 761.
- Lin T. T., Chen F. L., Chao N. H., 1995. Characterization and modeling cryoprotectant permeation to small abalone eggs. *Mem. Coll. Agric. Natl. Taiwan Univ.* 35 Ž1., 15–31 Žin Chinese with English summary.
- Lionetti F. J., Hunt S. M. y Lin P. S. 1976. Improved method for the cryopreservation of human red cells in liquid nitrogen with hydroxyethyl starch. *Cryobiology*. 13 (5): 489-499.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., y Darnel J. *Molecular Cell Biology*, 5a edicion. W. H. Freeman and company, Nueva York.
- McFradzen I. R. B. 1995. Cryopreservation of the sperm of the pacific *crassostreagigas*. En: Day, J G. y McLellan, M R. (eds.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Human Press Inc., Totowa, 145-149 p.
- Medeiros C. M. O., Forrel F., Oliveira A T. D. y Rodrigues J. L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology*. 57: 327-344.
- Montgomery D. C. 2001. *Design and analysis of experiments*. 5a Edicion. John Wiley and Sons Inc., Nueva York.
- Moos J., Visconti P. E., Moore G. D., Schultz R. M., Kopf G. S. 1995. Potential role of mitogen-activated protein kinase in pronuclear envelope assembly and disassembly following fertilization of mouse eggs. *Biol Reprod*. 53(3): 692 - 699.
- Mugishima H., Harada K., Chin M., Suzuki T., Takagi K., Hayakawa S., Sato K., Klein J. P. y Gale R. P. 1999. Effects of long-term cryopreservation on

hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplantation*. 23: 395–396.

Odintsova N., Kiselev K., Sanina N. y Kostetsky E. 2001. Cryopreservation of primary cell cultures of marine invertebrates. *CryoLetters*. 22: 299-310.

Özkavukcu S. y Erdemli E. 2002. Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. *Journal of Ankara Medical School*. 24 (4): 187-196.

Paynter S. J. y Fuller B. J. 2007. Cryopreservation of mammalian oocytes, en *Methods in Molecular Biology* TM368. Eds. John G Day y Glyn N Stacey. Humana Press Nueva Jersey. Págs.: 313 – 323.

Pegg D E. 2007. Principles of cryopreservation, en *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols Segunda Edición*, *Methods in Molecular Biology* TM 368. Eds. John G Day y Glyn N Stacey. Humana Press Nueva Jersey. Págs.: 39 – 57.

Pentfold L. M. y Watson P. F. 2001. The cryopreservation of gametes and embryos of cattles, sheep, goats and pigs, en *Cryobanking The Genetic Resources*, Watson P. F. y Holt W. V. *Wildlife Conservation for the Future?*. Eds. TAYLOR and FRANCIS, Nueva York. Páginas 279 – 316.

Picton H. M., Gosden R. G. y Leibo S. P. 2002. Cryopreservation of oocyte and ovarian tissue, en Vayena E., Rowe P. y Griffin P. D., Eds. *Current Practice and Controversies in Assisted Reproduction*. World Health Organization, Geneva. Pags. 142 – 151.

Portillo-López A. Gould M. C. y Stephano J. L. 2003. MAPK is involved in metaphase I arrest in oyster and mussel oocytes. *Biology of the Cell*. 95: 275 – 282.

Rana K. 1995. Preservation of gametes, en: Bromage N. y Roberts R. (eds.). *Broodstock management of egg and larval quality*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Págs. 53-73.

Rascón Heimpel G. A. 2008. Efecto de la criopreservación en la actividad de la MAP cinasa en los ovocitos de ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg). Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Científicas y Educación Superior de Ensenada, Ensenada, Baja California, México.

Riffell J. A., Krug P. J. y Zimmer R. K. 2002. Fertilization in the sea: the chemical density of an abalone sperm attractant. *The Journal of Experimental Biology*. 205: 1439 – 1450.

Semenova I. y Rodionov V. 2007. Fluorescence microscopy of microtubules in cultured cells, en *Microtubule protocols*. Jun Zhou Ed. Humana Press. Nueva Jersey. Pág. 93 – 102.

Song Y P, Suquet M, Quéau I y Lebrun L. 2009. Setting of a procedure for experimental fertilization of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. *Aquaculture*, 287:311–314.

Stephano J. L. y Gould M. C. 2000. MAP Kinase, a universal suppressor of sperm centrosomes during meiosis? *Developmental Biology*. 222: 420–428.

Tervit H. R., Adams S. L., Roberts R. D., McGowan L. T., Pugh P A, Smith J. F., Janke A. R. 2005. Successful cryopreservation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes, *Cryobiology*. 51: 2. 142 - 151.

Tiersch T. R. 2000. Introduction. En *Cryopreservation in Aquatic Species*. Tiersch, T. R. y P. M. Mazik, Editores. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. Pp. xxvi.

Torrentera Blanco L. y Tacon A. G. 1989. Apoyo a las actividades regionales de acuicultura para america latina y el caribe, PROYECTO GCP/RLA/075/ITA. FAO. Italia. <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB473S/AB473S00.htm>. Consultado el 18 de febrero de 2011 a las 12: 42 h.

Verlhac M. H., Kubiak J. Z., Clarke H. J., y Maro B. 1994. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*. 120: 1017–1025.

Walczak C. E. y Heald R. 2008. Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *International Review of Cytology*. 265: 111 – 157.

Walker J M. 1996. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, en *The protein protocols handbook*. John M. Walker Ed. Humana Press. Nueva Jersey. Pág.: 55 – 62.

Watson P. F. y Fuller B. J. 2001. Principles of cryopreservation of gametes and embryos, en *Cryobanking The Genetic Resources, Wildlife Conservation for the Future?*. Watson P F y Holt W V, Eds. TAYLOR and FRANCIS, Nueva York. Págs 21 – 43.

Witaker M. 1996. Control of meiotic arrest. *Review of Reproduction*. 1: 127 - 135.

Woods E. J., Benson, J B., Agca Y. y Critser, J K. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*. 48: 146–156.

Zar J. H. 1996. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey.

Zenses M. T., Bielecki R., Casper R. y Leibo S. P. 2001 Effects of chilling to 0°C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertility and Sterility*. 75: 769–777.

Zilli L., Schiavone R, Zonno V, Rossano R, Storelli C y Vilella S. 2005. Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. *Biology of Reproduction*. 72: 1262 - 1267.

Zilli L., Schiavone R., Storelli C. y Vilella S. 2008. Effect of cryopreservation on phosphorylation state of proteins involved in sperm motility initiation in sea bream. *Cryobiology*. 57: 150 – 155.

ANEXOS

Anexo I. Obtención de los gametos

Crassostrea gigas

Una vez obtenidos los organismos se deben limpiar con un cepillo y agua, para eliminar epibiontes y todo lo que este adherido a la concha.

Se pueden abrir con un destornillador en la charnela, con sumo cuidado ya que es posible lastimarse.

Una vez rota la charnela hacer palanca con el desarmador para abrir la concha sin romperla y, que se pueda ver en el interior del animal.

Con mucho cuidado y sin cortar la glándula digestiva, meter un bisturí y cortar el musculo abductor para abrir completamente el organismo.

Una vez abierto, enjuagar con AMF para limpiar los restos de concha que pudieran quedar.

Con la punta de una pipeta Pasteur de vidrio, raspar la gónada tomar una alícuota en un portaobjetos y revisar al microscopio el sexo, una vez identificado el sexo separarlo en un recipiente individual.

Repetir los pasos anteriores para cada organismo.

Cuando se tenga determinado el sexo de cada organismo, rasgar la gónada con la punta de la pipeta Pasteur de vidrio sin perforara la glándula digestiva.

Extraer la gónada hasta donde sea posible. Depositar la gónada en un recipiente en donde se agregara la gónada de los demos organismos del mismo sexo, para hacer un concentrado.

Se debe agregar AMF para suspender los gametos.

Cuando ya se tenga muestra suficiente, iniciar el tamizado de la muestra.

Para las hembras, colar varias veces la muestra por una luz de malla de 120 μm , vaciar esta muestra en tubos de fondo cónico, ya sean de 15 ml o 50 ml.

Centrifugar las muestras en una centrifuga manual, para que las células se vayan al fondo del tubo. Después, con una pipeta Pasteur de plástico eliminar el

sobrenadante y dejar las células concentradas. Y de este modo varias ocasiones, hasta que el agua de mar quede transparente y los ovocitos en el fondo.

Para el caso del espermatozoide, tamizar la muestra con una luz de malla de 30µm, varias veces y eliminar en lo más posible el tejido somático. En este caso no se puede centrifugar la muestra, por lo que necesariamente se tiene que tamizar en varias ocasiones.

Una vez procesadas todas las muestras, estas se deben conservar a 4°C, en tubos con AMF.

Haliotis rufescens

Prepara un recipiente de preferencia negro, dependiendo del número de animales que se quieran desovar, por ejemplo un contenedor de 3 litros para tres animales. Llenar el recipiente con 3 L de agua de mar y colocar los abulones (hembras o machos) en el interior, en seguida agregar 6.6 mL de una solución de TRIS 2 M, cubrirlo con una bolsa de plástico negra de manera que no entre luz y esperar 15 min. Después de este tiempo agregar 0.66 mL de peróxido de hidrogeno al 30%, nuevamente cubrir con la bolsa de plástico y esperar aproximadamente de 2 a 3 hr para que los abulones empiecen a desovar; en general las hembras se demoran más que los machos, durante este tiempo se debe agitar suavemente para estimular a los animales.

Vigilar constantemente para saber en qué momento se iniciara el desove y cuando este ocurra rápidamente tirar el agua de mar y enjuagar muy bien con agua de mar filtrada 0.2 µm y agregar nuevamente los 3 L de agua y se dejan los animales para que sigan con el desove, cubiertos con la bolsa de plástico.

Al final, filtrar los ovocitos en un tamiz de luz de malla de aprox. 120 µm, así la células se quedaran en la malla y finalmente estas se deben resuspender en AMF y conservarse en frío ~5°, no más de 3 hr.

Anexo II. Inmunocitoquímica para la visualización del huso y los cromosomas.

Lavar los ovocitos con agua de mar filtrada en una centrifuga manual por lo menos tres veces.

Resuspender en la solución fijadora, metanol 50 %, EGTA 50 mM a pH 6.8, de esta manera las muestras se pueden almacenar a -20 °C.

Sacar las muestras y atemperarlas.

Para realizar el análisis, las muestras se deben enjuagar dos veces en TS, amortiguador Tris salino, 140 mM NaCl + 10 mM Tris, pH 6.8, a temperatura ambiente.

Para el caso de los ovocitos de *H. rufescens*, después de ser lavado con TS se permeabilizará la membrana en una solución 1% de Tritón durante 20 min, y en seguida lavarse dos veces con TS.

En seguida, bloquear con BSA 1 % en TS durante 1 h a 37 °C, después enjuagar dos veces en TS.

Incubar con el primer anticuerpo antitubulina, 1:40, en BSA 1 % con TS durante 1 h a 37 °C y enjuagar dos veces en TS.

Incubar con el primer anticuerpo, 1:20, en BSA 1 % con TS durante 1 h a 37 °C y enjuagar dos veces en TS.

Una vez lavados los ovocitos, resuspender en TS y agregar 100 µL de la solución de trabajo de DAPI, incubar en la oscuridad de 10 a 20 min. Después de esto, enjuagar dos veces con TS y observar al microscopio de fluorescencia.

Para visualizar el huso acromático, en un microscopio de fluorescencia con luz verde y obtener fluorescencia naranja.

Para observar los cromosomas, se usa luz UV y se obtendrá fluorescencia azul.

Determinación de la organización de los cromosomas, Solución DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro)

Preparación de la solución concentrada.

El producto se comercializa en un peso total de 10 mg. Por lo que se debe preparar una solución concentrada, al frasco original se debe agregar 10 ml de agua destilada filtrada en una luz de malla de 0.2µm. Esta solución se debe conservar en un frasco protegido de la luz en el congelador de un refrigerador a -20°C.

Preparación de la solución de trabajo.

Descongelar la solución concentrada de DAPI, tomar una alícuota de 500 µL y agregar 50ml de agua destilada y 14 ml de formol.

Almacenar esta solución a 4°C protegido de la luz.

La solución se mantiene estable durante 6 meses, después de este tiempo se debe prepara una nueva solución de trabajo.

Procesamiento de las muestras.

De las muestras conservadas en formaldehido, realizar dos lavados de la siguiente manera.

1. Procesar la muestra en una centrifuga manual, eliminar el sobrenadante y conservar el botón de células.
2. Agregar AMF para resuspender la muestra, incubar 10 min y después repetir el paso anterior.
3. Repetir los pasos 1 y 2 dos tres veces y, finalmente dejar reposar la muestra durante 30 min en AMF.
4. Una vez transcurrido el tiempo, agregar 50 µL de la solución de trabajo de DAPI, incubar en la oscuridad durante 10 min.
5. Visualizar en el microscopio de fluorescencia, con una longitud de onda ex/em de 364/454 nm.

Anexo III. Detección de la MAPK

Western Blot.

1. Primeramente se debe ensamblar la cámara de electroforesis con los dos cristales.
2. Preparar el **gel de corrido** para llenar la cámara formada por los dos cristales. Se debe llenar de un solo lado para que el gel quede nivelado y a dos centímetros antes del final de la cámara.
3. Una vez llenada la cámara, se debe llenar hasta el borde con alcohol isopropílico y, esperar 30 min para el gel se polimerice.
4. Una vez transcurrido el tiempo, se debe tirar el alcohol y secar el excedente con papel secante. En este momento se debe preparar el **gel de separación**.
5. Llenar al hasta el borde con el **gel de separación** e inmediatamente colocar el peine. para crear los pozos donde cargar las muestras. Esperar 30 min para que el gel se solidifique.

Electroforesis.

1. Descongelar las muestras criopreservadas siguiendo el protocolo establecido.
2. Tomar 25 μL , centrifugar a 14 000 rpm durante 10 s, eliminar el sobrenadante y conservar el botón de células.
3. Agregar 5 μL del coctel inhibidor de fosfatasas.
4. Agregar 25 μL del amortiguador de muestra.
5. Incubar a temperatura ambiente.

Muestras control e incubadas:

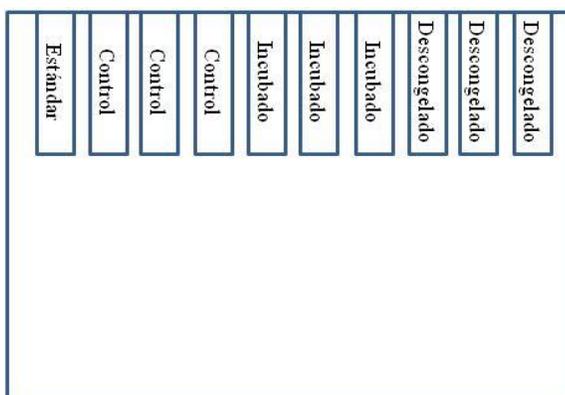
Descongelar a temperatura ambiente las muestras almacenadas a -20°C , centrifugar a 14 rpm durante 10 s y utilizar el sobrenadante.

Inicio de la electroforesis.

Para este momento ya se debe tener el gel de separación solidificado y ensamblado en la cámara de electroforesis y con el amortiguador de electroforesis.

Se formaron diez pozos, por lo tanto el primer carril corresponde al estándar de proteínas.

Los siguientes corresponden a los controles frescos con tres réplicas, los tres siguientes a las muestras incubadas en los crioprotectores y finalmente las muestras criopreservadas-descongeladas. Se deben cargar 10 μ L de cada muestra a analizar.



Disposición de las muestras en el gel para la electroforesis.

Conectar la fuente de poder y correr la electroforesis a 120 V, se demora ~ 2 hrs.

Inmunotransferencia.

Una vez terminada la electroforesis, preparar un recipiente rectangular conteniendo el amortiguador de muestra. En ella debe estar sumergido el casete de transferencia con la almohadilla y el papel filtro.

Separar el gel de la parte superior de los cristales e inmediatamente colocar el gel sobre el papel filtro embebido con el amortiguador de transferencia.

Antes de esto, la membrana PVDF se cortará a la medida del gel y se humedecerá en metanol 100%, e inmediatamente se colocara en el amortiguador de transferencia para estabilizar la membrana PVDF y se debe ser colocada sobre el gel, que previamente debe estar sobre el papel filtro dentro del amortiguador de transferencia.

La disposición es la siguiente, del lado negro de casete, la almohadilla, el papel filtro, el gel, membrana PVDF (previamente sumergido en metanol 100% y equilibrado en el amortiguador de transferencia).

Una vez hecho el casete se colocara en la cámara, se colocara la barra de hielo y se llenará con el amortiguador de transferencia hasta que el casete se cubra completamente.

Se realizará la inmunotransferencia a corriente constante de 100 V durante 1hr, con el amortiguador de transferencia frío y con agitación.

Al final del proceso de transferencia se desconectará de la fuente de energía eléctrica y se quitará la membrana PVDF del casete de transferencia

En seguida, se enjuagará la membrana boca arriba, durante 10 minutos con el amortiguador TBST.

Exposición a los anticuerpos.

1. Incubar la membrana boca abajo, con una solución de leche baja en grasas al 5% en TBST, toda la noche a 4°C, sin agitación.
2. Al siguiente día. Colocar la membrana en una solución fresca de 10 ml de leche baja en grasa 5% en TBST con 8 µL del primer anticuerpo policlonal

anti-fosfo p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204, Cell Signaling Tehnology Inc.). Se incubar la membrana boca abajo toda la noche a 4°C con agitación suave.

3. Al siguiente día se lavará la membrana boca arriba, tres veces con 25 ml del amortiguador TBST, por 15 min a temperatura ambiente con agitación suave.
4. Enseguida se pondrá en 10 ml de TBST y se le añadirá 4 µL del segundo anticuerpo antio IgG conjugado con peroxidasa (Cell Signaling Tehnology Inc.), y se incubara a temperatura ambiente 1 h, con agitación suave, boca abajo.
5. Posteriormente, la membrana se escurrirá y se colocara sobre plástico transparente y se le añadirá una mezcla del sustrato luminiscente (Amersham, GE) preparado de la siguiente forma: 3 ml de la solución A y 75 µL de la solución B, se dejará por 3 minutos.
6. Transcurridos los 3 min, se debe escurrir y colocarse sobre plástico transparente nuevo y envolverla para después colocarla dentro del casete radiográfico.

Revelado

¡En oscuridad completa!

1. Exponerla la membrana al film fotográfico por 15 s. Abajo la membrana envuelta boca arriba y sobre ella el film.
2. Colocar el film durante un minuto en la solución reveladora.
3. Enjuagar en agua.
4. Colocar el film 1 min en la solución fijadora y,
5. como último enjuagar el film en agua.
6. Finalmente escanear el film revelado.